

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO DA ESTABILIDADE  
DO MALEATO DE ENALAPRIL**

Dissertação apresentada por  
Norberto Rech para a obtenção  
do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre  
1993

Dissertação apresentada e aprovada em 26 de março de 1993,  
perante a Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ligia Maria Moreira de Campos  
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Ivone Sartor  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

R196c

Rech, Norberto

Controle de qualidade e estudo da  
estabilidade do maleato de enala-  
pril. / Norberto Rech . - . Porto Ale-  
gre: UFRGS, 1993. - 167p.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Facul-  
dade de Farmácia.

1.Medicamentos 2.Controle de qualidade  
3.Estabilidade 4.Maleato de enalapril  
I.Schapoval, Elfrides E.S. II.Título

CDU: 615.2.074



#### Índices para catálogo sistemático:

- 1.Medicamentos: controle de qualidade 615.2.074
- 2.Medicamentos: estabilidade 615.014.42

***Para minha mãe, Maria Margarida, pela vida,  
pelo amor e pelo incentivo.***

***A D. Marina, exemplo vivo de esperança.***

***Para Mário André, companheiro de todos os  
momentos.***

***Morrer jovem é mais do que morrer !***

***À memória dos amigos Gerson e Isnard, cuja  
partida nos deixou uma saudade sempre  
presente.***



## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Dr<sup>a</sup>. Elfrides Eva Scherman Schapoval pelo incentivo recebido e por sua constante contribuição ao ensino e à pesquisa na área das Ciências Farmacêuticas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao Professor Dr. Eloir Paulo Schenkel pelo auxílio e estímulo recebidos durante minha vida profissional.

À CAPES/PICD pela concessão da Bolsa de Estudo.

Aos amigos Margareth Linde Athayde e Valdemar Batista, cujo apoio e amizade tornaram possível a realização deste trabalho.

À amiga Professora Walesca P.C. de Lemos pelo auxílio constante.

Aos amigos Clarice, Lorena, Lucimar, Marlise, Neila, Severino e Tércio, que contribuíram de várias formas para a realização desta Dissertação e possibilitaram uma troca harmoniosa de experiências.

Ao Professor Dr. Eliezer J. Barreiro (UFRJ), pelo auxílio na avaliação dos prováveis produtos de degradação do maleato de enalapril.

Ao Professor Dr. Jean Huet (Universidade de Rennes), pelas sugestões quanto aos métodos espectrofotométricos pelo sulfato de cobre e pelo cloreto de ferro III.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Norma Ethel Sbarbati de Nudelman (Universidade de Buenos Aires), pelas sugestões quanto aos ensaios de estabilidade.

Ao amigo e colega Professor Ricardo da Rocha Pereira (UFSC), por possibilitar meu afastamento das atividades didáticas e pelo incentivo e apoio constantes.

À amiga e colega Professora Dr<sup>a</sup>. Marení Rocha Farias (UFSC), pelo auxílio na elaboração do tópico "Relação estrutura-atividade".

À amiga Carmen J. Nietzsche, pelo apoio incansável em relação aos procedimentos necessários junto ao Departamento de Pós-Graduação (PRPG/UFSC).

Ao meu irmão Carlos Henrique Rech e ao amigo Fernando O.R. da Silva, pelo auxílio com os programas de computador.

À Angelita e Carolina, pelo carinho dispensado à minha mãe, o que tornou mais fácil meu afastamento.

Aos funcionários Alice Brenner, Judite da Silva Fão, Marco Antônio Vieira dos Santos e Ronal Costa, cujo auxílio foi fundamental em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos Ângelo C. Scussiato, José Luis Morales, Nicolau Marques Jr., Paulo R. Wollinger e Wilson Luiz, que sempre estiveram próximos e me permitiram, com sua amizade, transpor os momentos difíceis.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xx
I. INTRODUÇÃO .....	001
1.1. Revisão bibliográfica .....	008
1.1.1. Síntese .....	008
1.1.2. Estudos farmacodinâmicos .....	009
1.1.2.1. Efeitos sobre o sistema renina-angiotensina-	
-aldosterona .....	009
1.1.2.2. Efeitos sobre o sistema caliceína-cinina-	
-prostaglandina .....	012
1.1.2.3. Efeitos hemodinâmicos .....	014
1.1.2.4. Efeitos sobre a função renal .....	018
1.1.2.5. Mecanismo de ação .....	020
1.1.3. Estudos farmacocinéticos .....	021
1.1.4. Relação estrutura-atividade .....	024
1.1.5. Efeitos adversos .....	031
1.1.6. Interações medicamentosas .....	035
1.1.7. Análise e quantificação do maleato de enalapril .....	036

II. MATERIAL E MÉTODOS .....	044
2.1. Materiais .....	044
2.1.1. Produto farmacêutico .....	044
2.1.2. Padrão .....	045
2.1.3. Reagentes .....	046
2.1.4. Aparelhos e equipamentos .....	047
2.2. Métodos .....	049
2.2.1. Análise físico-química das amostras .....	049
2.2.1.1. Caracteres organolépticos .....	049
2.2.1.2. Dimensões .....	049
2.2.1.3. Peso médio .....	049
2.2.1.4. Friabilidade .....	049
2.2.1.5. Dureza .....	050
2.2.1.6. Desintegração .....	050
2.2.1.7. Umidade .....	050
2.2.1.8. Identificação do maleato de enalapril .....	050
2.2.1.8.1. Extração da substância ativa .....	051
2.2.1.8.2. Cromatografia em camada delgada .....	051
2.2.1.8.3. Espectroscopia na região do infra- vermelho .....	052
2.2.1.8.4. Determinação do ponto de fusão .....	052
2.2.1.8.5. Determinação do poder rotatório .....	053
2.2.2. Estabelecimento de método alternativo para a quantifi- cação do maleato de enalapril .....	053

2.2.2.1.	Método espectrofotométrico por pareamento	
	iônico com azul de bromotimol .....	053
2.2.2.1.1.	Preparo da solução de azul de bro-	
	motimol 0,05 % .....	053
2.2.2.1.2.	Preparo da solução padrão .....	054
2.2.2.1.3.	Curva padrão .....	054
2.2.2.1.4.	Análise estatística .....	055
2.2.2.2.	Método espectrofotométrico pelo sulfato de	
	cobre .....	055
2.2.2.2.1.	Preparo da solução de sulfato de	
	cobre 5% .....	055
2.2.2.2.2.	Preparo da solução padrão .....	056
2.2.2.2.3.	Preparo da curva padrão .....	056
2.2.2.2.4.	Execução do ensaio .....	056
2.2.2.3.	Método espectrofotométrico pelo cloreto de	
	ferro III .....	057
2.2.2.3.1.	Preparo da solução de cloreto fér-	
	rico 5% .....	057
2.2.2.3.2.	Preparo da solução de hidroxilamina	
	0,5 M .....	058
2.2.2.3.3.	Preparo da solução padrão .....	058
2.2.2.3.4.	Preparo da curva padrão .....	058
2.2.2.3.5.	Execução do ensaio preliminar .....	058
2.2.2.3.6.	Execução do ensaio .....	059

2.2.2.4.	Método fluorimétrico pelo 4-cloro-7-nitro- benzeno-2-oxa-1,3-diazol (cloreto de NBD) .....	059
2.2.2.4.1.	Placas cromatográficas .....	060
2.2.2.4.2.	Preparo do reagente para reve- lação .....	060
2.2.2.4.3.	Preparo da solução padrão .....	060
2.2.2.4.4.	Preparo da curva padrão .....	060
2.2.2.4.5.	Execução do ensaio .....	061
2.2.2.5.	Método fluorimétrico pelo o-ftaldialdeído .....	062
2.2.2.5.1.	Preparo do reagente fluorogênico.....	062
2.2.2.5.2.	Preparo da solução padrão .....	063
2.2.2.5.3.	Preparo da curva padrão .....	063
2.2.2.5.4.	Execução do ensaio .....	063
2.2.2.6.	Cromatografia líquida de alta eficiência .....	064
2.2.2.6.1.	Preparo da solução padrão .....	064
2.2.2.6.2.	Preparo da curva padrão .....	066
2.2.2.6.3.	Preparo das amostras .....	066
2.2.2.6.4.	Execução do ensaio .....	066
2.2.2.6.5.	Cálculos .....	067
2.2.2.6.6.	Teste de recuperação .....	068
2.2.2.6.7.	Obtenção dos principais produ- tos de degradação .....	068
2.2.3.	Estudo da estabilidade .....	070
2.2.3.1.	Estabilidade térmica .....	070
2.2.3.2.	Estabilidade frente à umidade .....	071
2.2.3.3.	Estabilidade fotoquímica .....	072

III. RESULTADOS .....	074
3.1. Análise físico-química das amostras .....	075
3.2. Identificação do maleato de enalapril .....	077
3.2.1. Cromatografia em camada delgada .....	077
3.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho .....	081
3.2.3. Determinação do ponto de fusão .....	083
3.2.4. Detérminação do poder rotatório .....	083
3.3. Estudo de métodos para quantificação do maleato de enalapril .....	083
3.3.1. Método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol .....	083
3.3.2. Método espectrofotométrico pelo sulfato de cobre .....	087
3.3.3. Método espectrofotométrico pelo cloreto de ferro III .....	087
3.3.4. Método fluorimétrico pelo 4-cloro-7-nitrobenzeno-2-oxa- -1,3-diazol (cloreto de NBD) .....	088
3.3.5. Método fluorimétrico pelo o-ftaldialdeído .....	089
3.3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	089
3.4. Estudo da estabilidade .....	099
3.4.1. Estabilidade térmica .....	099
3.4.2. Estabilidade frente à umidade .....	110
3.4.3. Estabilidade fotoquímica .....	111
IV. DISCUSSÃO .....	112

V. CONCLUSÕES .....	140
---------------------	-----

VI. BIBLIOGRAFIA .....	144
------------------------	-----



## **RESUMO**

No presente estudo, visando a quantificação do maleato de enalapril, foram avaliados os métodos espectrofotométricos por pareamento iônico com azul de bromotimol, por complexação com cobre e por reação com cloreto de ferro III, bem como os métodos fluorimétricos empregando cloreto de NBD e o-ftaldialdeído como reagentes fluorogênicos.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência, adaptado da literatura e modificado pelo autor, foi utilizado para a determinação quantitativa do maleato de enalapril, tanto sob a forma de matéria - prima como de produto acabado. Após a padronização, empregou-se este método como referência para os estudos de estabilidade térmica, fotoquímica e frente à umidade, aos quais foi submetida a especialidade farmacêutica disponível no mercado brasileiro.

Os resultados obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência, demonstraram haver reprodutibilidade e sensibilidade do método, bem como sua utilidade para a identificação dos principais produtos de degradação.

## **ABSTRACT**

The objectives of the present study were to quantify enalapril maleate in tablets and to analyse its stability. The methods of analysis assessed for this purpose were: the spectrophotometric methods of ion - pairing with bromothymol blue, complexation with copper and reaction with iron III chloride; the fluorometric assay employing NBD chloride and orthophthalaldehyde as fluorogenic agents as well as high performance liquid chromatography (HPLC).

The latter method, adapted and modified by the author, was employed to quantify enalapril maleate contained in the raw material as well as in the oral tablets. Having obtained the relevant data, HPLC was also employed to determine degradation induced by light, temperature and humidity.

The results obtained have not only proved that HPLC is sufficiently reproducible and sensitive, but also provided a reliable way to identify the main degradation products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação simplificada dos sistemas renina - angiotensina - aldosterona e calicreína-cinina-prostaglandina e seus efeitos sobre a homeostase cardiovascular (Adaptada de TODD & HEEL, 1986 e FERRARIO, 1990).....	003
Figura 02: Estruturas químicas de enalapril, enalaprilato e derivado dicetopiperazínico .....	005
Figura 03: Representação esquemática da síntese do maleato de enalapril .....	008
Figura 04: Ligação de um peptídeo com o centro ativo da ACE .....	025
Figura 05: Estruturas químicas de alguns inibidores da ACE .....	026
Figura 06: Ligação do captopril com o sítio ativo da ACE .....	027
Figura 07: Estrutura geral dos dipeptídeos inibidores da ACE .....	028
Figura 08: Interação do enalaprilato com o sítio ativo da ACE .....	029
Figura 09: Estrutura do enalaprilato, determinada por cristalografia de raio-X .....	030
Figura 10: Variação de peso dos comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril .....	076

Figura 11: Variação de dureza dos comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril .....	076
Figura 12: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril (SISTEMA A) .....	078
Figura 13: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril (SISTEMA B) .....	079
Figura 14: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril (SISTEMA C) .....	080
Figura 15: Espectro de infravermelho do maleato de enalapril extraído dos comprimidos, obtido por dispersão em KBr .....	082
Figura 16: Representação gráfica da curva padrão de maleato de enalapril, obtida através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol, $\lambda = 405 \text{ nm}$ .....	086
Figura 17: Representação gráfica da curva padrão de maleato de enalapril, obtida por CLAE .....	092
Figura 18: Cromatograma obtido para o maleato de enalapril através de CLAE .....	094
Figura 19: Cromatograma obtido para o produto de hidrólise do enalapril, através de CLAE .....	097
Figura 20: Cromatograma obtido para o produto de ciclização do enalapril, através de CLAE .....	098

Figura 21: Representação gráfica da curva de degradação térmica do maleato de enalapril, à temperatura de 60 °C .....	107
Figura 22: Representação gráfica da curva de degradação térmica do maleato de enalapril, à temperatura de 80 °C .....	108
Figura 23: Cromatograma de amostra de maleato de enalapril degradada à temperatura de 80 °C, obtido através de CLAE .....	109
Figura 24: Complexação de cobre com trietilenotetramina .....	125
Figura 25: Reações gerais para o ensaio do ácido hidroxâmico .....	126
Figura 26: Espectros de excitação e emissão de uma espécie fluorescente .....	129
Figura 27: Estrutura química do cloreto de NBD .....	130
Figura 28: Reação geral para o cloreto de NBD e aminas .....	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Fórmula unitária da forma farmacêutica em estudo .....	045
Tabela 02: Condições observadas no desenvolvimento do método por CLAE .....	065
Tabela 03: Composições das soluções de ácido sulfúrico .....	071
Tabela 04: Resultados da análise físico-química dos comprimidos de maleato de enalapril 20 mg .....	075
Tabela 05: Valores de R <sub>f</sub> para o maleato de enalapril .....	077
Tabela 06: Absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão, através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol, $\lambda = 405 \text{ nm}$ .....	084
Tabela 07: Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de maleato de enalapril, através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol .....	085
Tabela 08: Áreas absolutas e tempos de retenção para enalapril (base), em diferentes concentrações, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, para a determinação da curva padrão .....	090

Tabela 09: Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão, através do método por cromatografia líquida de alta eficiência .....	091
Tabela 10: Valores obtidos para o doseamento do maleato de enalapril através de cromatografia líquida de alta eficiência .....	095
Tabela 11: Dados de recuperação de uma solução padrão de maleato de enalapril adicionada à solução amostra, através de cromatografia líquida de alta eficiência .....	096
Tabela 12: Teores percentuais obtidos no estudo da estabilidade térmica dos comprimidos de maleato de enalapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência .....	100
Tabela 13: Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 40 °C, considerando-se diferentes ordens de reação .....	101
Tabela 14: Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 60 °C, considerando-se diferentes ordens de reação .....	102
Tabela 15: Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 80 °C, considerando-se diferentes ordens de reação .....	103
Tabela 16: Teores percentuais obtidos no estudo da estabilidade frente a diferentes umidades relativas, para comprimidos de maleato de enalapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência .....	110

Tabela 17: Valores obtidos na avaliação da degradação fotoquímica de maleato de enalapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência ..... 111



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACE	=	Angiotensin-converting enzyme ( Enzima conversora de angiotensina)
AUFS	=	Absorbance units of full scale (Unidades de absorvância de escala cheia)
CLAE	=	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	=	Coeficiente de variação percentual
e.p.m.	=	Erro padrão da média
HPLC	=	High performance liquid chromatography
r	=	Coeficiente de correlação
SD	=	Sensibilidade do detector
UR	=	Umidade relativa
UV	=	Ultravioleta

## **I - INTRODUÇÃO**

O sistema renina-angiotensina-aldosterona desempenha papel importante na regulação da homeostase cardiovascular (Figura 1), tanto em indivíduos normais como hipertensos, embora sua contribuição precisa na síndrome de insuficiência cardíaca congestiva permaneça pouco clara (TODD & HEEL, 1986; ERTL et al., 1987; JOHNSTON, 1990).

A renina é a enzima responsável pela clivagem da glicoproteína angiotensinogênio à forma de angiotensina I, a qual apresenta propriedades vasoativas mínimas. Porém, a ação da enzima conversora de angiotensina sobre o decapeptídeo angiotensina I, leva à formação do octapeptídeo angiotensina II. A conversão ocorre principalmente nos pulmões, embora outros órgãos também estejam envolvidos (TODD & HEEL, 1986; JOHNSTON, 1990; FERRARIO, 1990; DZAU, 1990).

A angiotensina II é um vasoconstritor bastante potente, atuando principalmente sobre o sistema vascular arterial, aumentando a resistência vascular sistêmica, ao mesmo tempo em que estimula a secreção de aldosterona a partir das glândulas adrenais, promovendo a retenção de sódio e água pelos rins. Sob condições normais, a resultante elevação da pressão sanguínea, do volume de fluido extracelular e dos níveis de angiotensina II, exerce um "feedback" negativo sobre a liberação de renina, constituindo-se num sistema útil para a manutenção da homeostase cardiovascular (TODD & HEEL, 1986; JOHNSTON, 1990; FERRARIO, 1990).

A inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona produz alterações hemodinâmicas favoráveis, as quais beneficiam os pacientes hipertensos ou com insuficiência cardíaca congestiva (COHEN & KURTZ, 1982; CANNON et al., 1983; CLELAND et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; FERRARIO, 1990; DZAU, 1990).

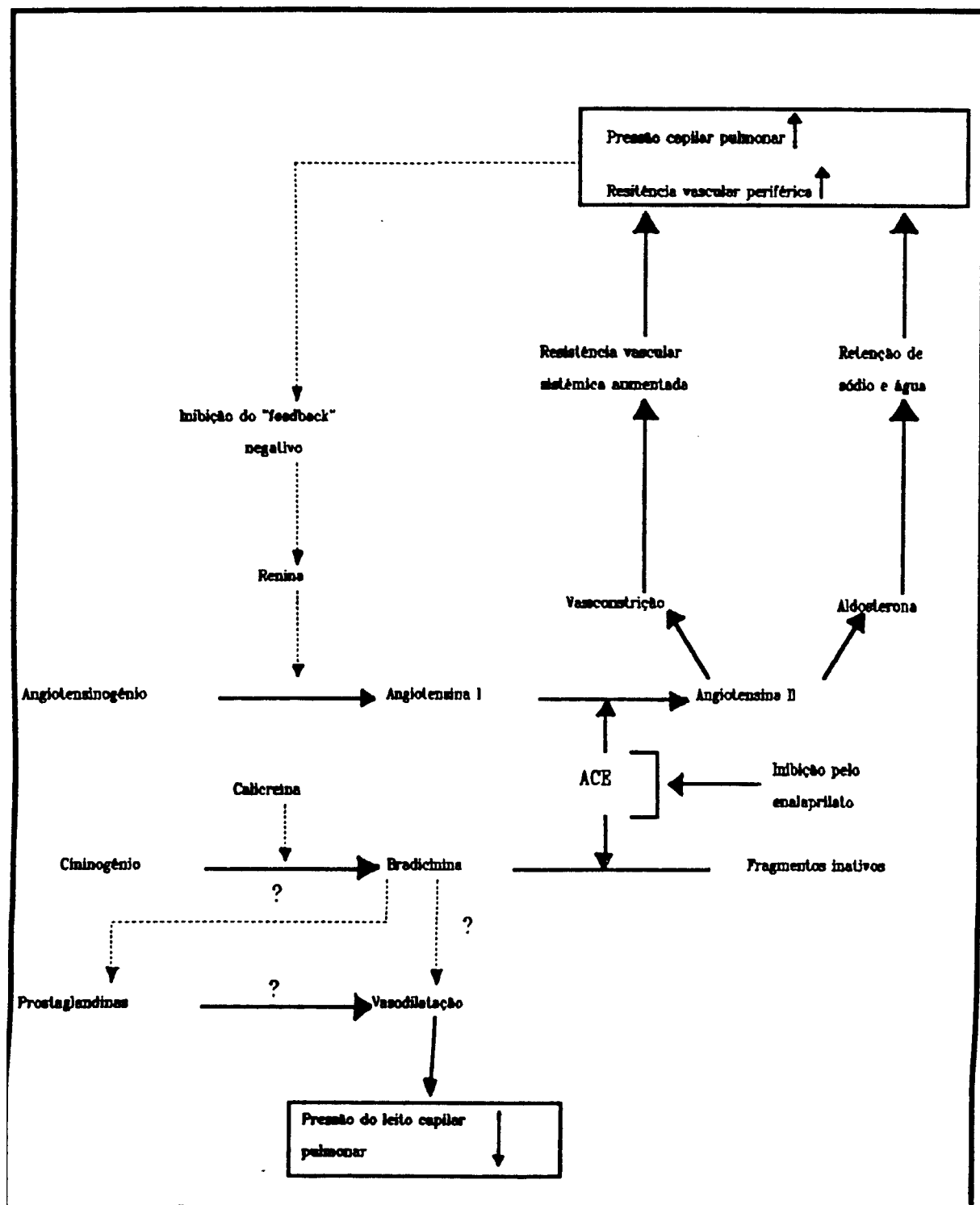


Figura 1: Representação simplificada dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e caliceína-cinina-prostaglandina e seus efeitos sobre a homeostase cardiovascular (Adaptada de TODD & HEEL, 1986 e FERRARIO, 1990).

A introdução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE), no tratamento de pacientes hipertensos e indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva, representou avanço significativo no controle de tais patologias (FERRARIO, 1990; GILES, 1990; GUERET, 1990).

Estudos recentes indicam que os agentes inibidores da ACE reduzem a pressão sanguínea por normalização da resistência periférica total sem, no entanto, levar à ativação de reflexos cardiovasculares compensatórios (FROHLICH, 1989). Dados experimentais sugerem que tais inibidores constituem-se em agentes antihipertensivos efetivos e bem tolerados no tratamento de pacientes com insuficiência renal crônica (OPSAHL, 1990).

A primeira substância descrita como tendo ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina foi um teprotídeo, isolado do veneno de *Bothrops jararaca* (jararaca), encontrada no Brasil e Argentina. Este teprotídeo pode ser caracterizado como um nonapeptídeo sem ação tóxica e com propriedade antihipertensiva, sendo que o teprotídeo mais ativo apresenta o aminoácido prolina em sua estrutura. Em 1970, foram isolados vários undecapeptídeos com ação inibidora da ACE, a partir do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffi*, cobra encontrada no Japão (ULM, 1983; OTTO, 1989).

Em 1980, PATCHETT e colaboradores descreveram dipeptídeos N-carboximetil substituídos como uma nova classe de inibidores potentes e específicos da enzima conversora de angiotensina.

O enalapril, (S) - [ N- [ 1 - (etoxicarbonil) - 3 - fenil - propil ] - L-alanil ] - L - prolina, sob a forma de sal do ácido maleico (Figura 2), foi o segundo

agente inibidor da ACE a estar disponível comercialmente, sendo considerado como um pró-fármaco, o qual é rapidamente hidrolisado após absorção, originando o enalaprilato (Figura 2) como seu metabólito ativo (PATCHETT et al., 1980; GROSS et al., 1981; TOCCO et al., 1982; PATCHETT, 1984; KATO, 1985; TODD & HEEL, 1986; OKLOBDIZIJA et al., 1988; FRIEDMAN & AMIDON, 1989, TODD & GOA, 1992).

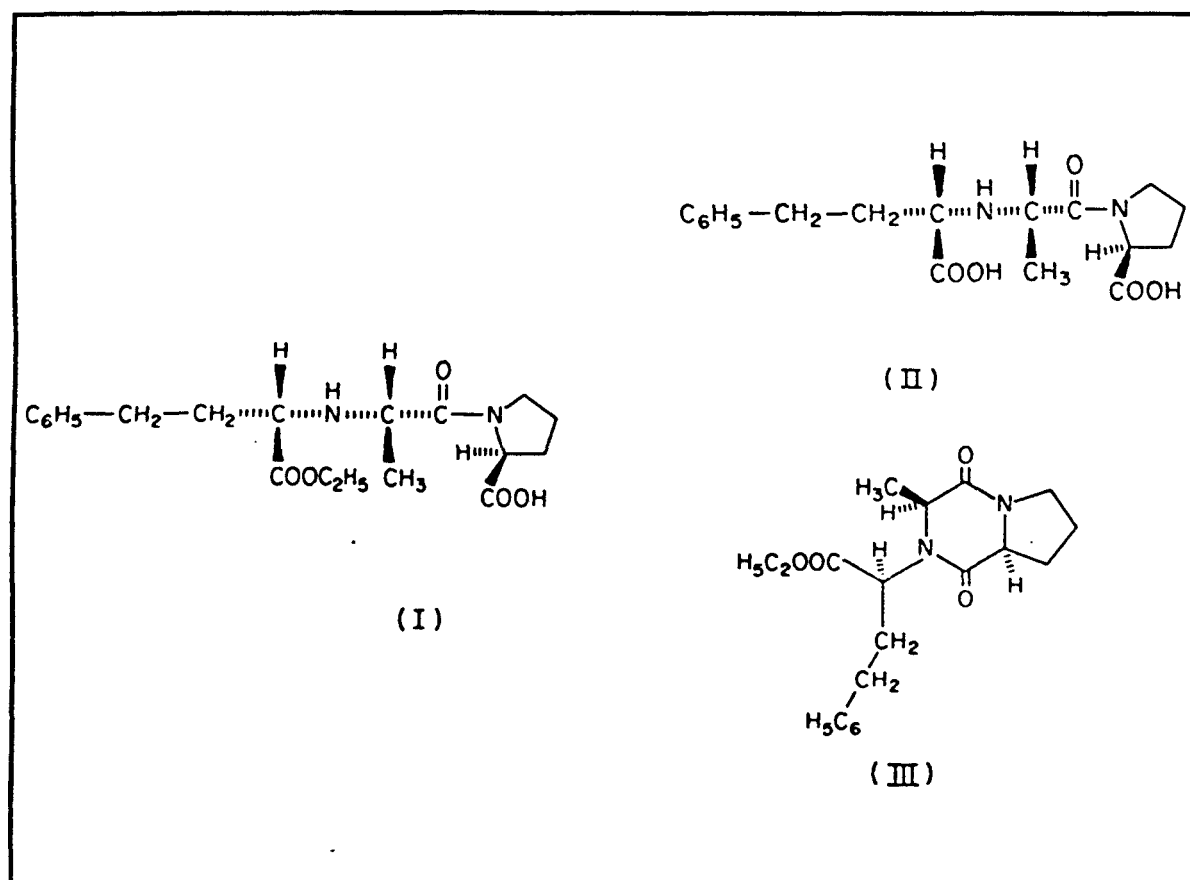


Figura 2: Estruturas químicas de enalapril ( I ), enalaprilato ( II ) e derivado dicetopiperazínico ( III ).

Embora o enalaprilato tenha sido a substância sintetizada inicialmente, a obtenção de seu éster etílico, como sal do ácido maleico (enalapril), resultou da necessidade em se obter um produto com melhor absorção após administração oral. Tal artifício demonstrou-se efetivo, não alterando as propriedades antiipertensivas desejadas (BIOLLAZ et al., 1981; GROSS et al., 1981; GAVRAS et al., 1981; SWEET et al., 1981; DAVIES et al., 1984; PATCHETT, 1984; FRIEDMAN & AMIDON, 1989).

Quanto aos procedimentos indicados para a análise e quantificação do maleato de enalapril, ao contrário do que ocorre com os relatos de estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, as informações disponíveis na literatura são em número reduzido, sendo que alguns dados são apresentados de forma incompleta, o que dificulta a reprodução dos experimentos realizados.

Objetivou-se, com o presente trabalho, realizar estudo visando o estabelecimento de método simplificado e alternativo para a quantificação do maleato de enalapril. Avaliou-se a possibilidade de emprego dos métodos espectrofotométricos por pareamento iônico com azul de bromotimol, por complexação com sulfato de cobre e por reação com cloreto de ferro III. Também foram avaliados os métodos fluorimétricos utilizando cloreto de NBD e o-ftaldialdeído como reagentes fluorogênicos. Ainda na busca de alternativa viável, procedeu-se modificações no método descrito por SIDHU e colaboradores (1987), através de CLAE. Este último método, devidamente modificado, constitui contribuição do autor para a determinação quantitativa do maleato de enalapril, tanto sob forma de matéria - prima como de produto acabado. As alterações efetuadas foram norteadas pela necessidade de simplificação dos procedimentos, visando facilitar o controle de qualidade do fármaco em estudo.

Após a padronização do método por CLAE, este foi utilizado como referência para os estudos de estabilidade térmica, fotoquímica e frente à umidade, da especialidade farmacêutica contendo maleato de enalapril à disposição no mercado brasileiro. Tais estudos constituem-se em iniciativas importantes, uma vez que é escassa a bibliografia referente a este aspecto. Por outro lado, os dados obtidos a partir do acompanhamento da estabilidade do produto acabado, nas diferentes condições experimentais empregadas, são fundamentais para a avaliação e garantia da qualidade do medicamento colocado à disposição do consumidor.



1.1. Revisão bibliográfica

1.1.1. Síntese

A Figura 3 apresenta o esquema de síntese do maleato de enalapril.

O etil-2-oxo-4-fenilbutanoato (1) é condensado com L-alanil-L-prolina (2), originando a base de Schiff correspondente (3), como uma mistura de isômeros *sin* e *anti*. A redução da ligação imina em 3 resulta na formação da mistura diastereoisomérica (4) (SSS e RSS). O diastereoisômero biologicamente mais ativo (SSS) é isolado por cristalização fracional, fornecendo maleato de enalapril (5), com grau de pureza acima de 99% e rendimento entre 32 e 34% (PATCHETT et al., 1980). Além desta rota de síntese, outras têm sido relatadas na literatura (IP & BRENNER, 1987).

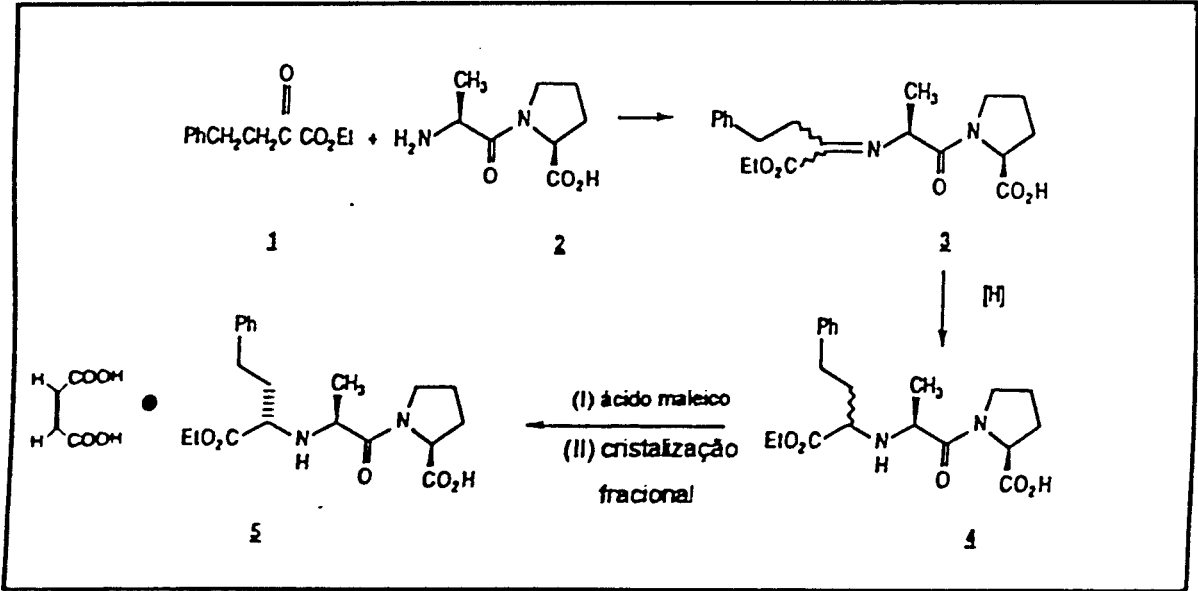


Figura 3: Representação esquemática da síntese do maleato de enalapril.

### **1.1.2. Estudos farmacodinâmicos**

#### **1.1.2.1. Efeitos sobre o sistema renina-angiotensina aldosterona**

Como foi mencionado no início deste capítulo, o sistema renina-angiotensina-aldosterona desempenha papel importante na regulação da homeostase cardiovascular.

Neste sistema hormonal a angiotensina II ativa é produzida por uma série de cascatas enzimáticas, resultante da ação da renina liberada pelos rins sobre um substrato específico presente no sangue (JOHNSTON, 1990). Embora atue como um sistema endócrino circulante clássico, acentuam-se as evidências de que este sistema pode desempenhar importante papel autócrino ou parácrino local, numa variedade de tecidos (CAMPBELL, 1987; JIN et al., 1988; JOHNSTON, 1990).

A angiotensina II é um potente agente vasoconstritor, bem como estimulante humoral para a secreção de aldosterona. Estudos sobre a bioquímica do sistema renina-angiotensina-aldosterona sugerem que este peptídeo apresenta ações importantes na regulação da função renal, secreção endócrina e tono vasomotor periférico (FERRARIO et al., 1986; FERRARIO, 1990).

A aplicação de técnicas de biologia molecular ao estudo dos genes que codificam angiotensina II e as enzimas responsáveis por sua produção, demonstrou que o sistema renina-angiotensina-aldosterona existe em outros órgãos além dos rins e forneceu novos conhecimentos sobre o papel deste sistema na regulação da pressão sanguínea. Da mesma forma, obteve-se melhor compreensão sobre o mecanismo envolvido na ação da angiotensina II tecidual sobre o desenvolvimento da hipertensão essencial, bem como sobre a contribuição do referido sistema na patogênese da

insuficiência cardíaca congestiva e arritmias cardíacas (ERTL et al., 1987; FERRARIO, 1990). Estudos de fisiologia sugerem que a angiotensina II é capaz de atuar sobre os neuroreceptores localizados na medula oblonga, estimulando a atividade nervosa simpática, a secreção de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, bem como a liberação de vasopressina neuroipofisária (FERRARIO et al., 1987). Tendo em vista a presença de receptores para angiotensina nos circuitos neuronais da medula oblonga que controlam a função cardiovascular, acredita-se que suas ações centrais estejam relacionadas ao mecanismo envolvido na patogênese da hipertensão essencial (ANDREATTA et al., 1988; FERRARIO et al., 1990).

A renina é uma aspartil protease cuja forma ativa consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfeto, o que resulta numa estrutura bilobular com um sítio ativo, semelhante àquele presente em outras proteases. Esta enzima proteolítica atua apenas sobre o angiotensinogênio, seu substrato específico, o qual sofre clivagem no N<sub>2</sub>-terminal entre a ligação leucina<sup>10</sup>-valina<sup>11</sup>, levando à formação de angiotensina I (MORRIS, 1989; JOHNSTON, 1990).

A enzima conversora de angiotensina (ACE), também conhecida como cininase II (VLASSES et al., 1985), é uma dipeptidil peptidase, largamente distribuída em muitos tecidos (CALDWELL et al., 1976; DZAU & PRATT, 1986), estando presente em vários tipos diferentes de células, tais como as células neuronais, monócitos, células do túbulo renal proximal e células epididimais. Todavia, a principal localização da enzima é nas células endoteliais, estando ligada à superfície da

membrana endotelial através de um peptídeo, o qual pode sofrer clivagem e liberar a enzima solúvel, sendo que a quantidade da enzima liberada para a circulação é relativamente baixa, se comparada com aquela presente no endotélio vascular. Esta enzima é responsável pela clivagem do dipeptídeo histidina<sup>9</sup>- leucina<sup>10</sup>, presente na cadeia terminal do decapeptídeo angiotensina I inativo, convertendo-o no octapeptídeo biologicamente ativo angiotensina II (DZAU, 1990; JOHNSTON, 1990).

Embora seja reconhecida como responsável pela conversão de angiotensina I à forma de angiotensina II, a ACE, ao contrário da renina, pode ser caracterizada como uma metaloprotease não específica, capaz de degradar o vasodilatador bradicinina e atuar sobre substratos neuropeptídicos como encefalina, neurotensina e substância P (SKIDGEL et al., 1984; SKIDGEL & ERDÖS, 1985; SKIDGEL & ERDÖS, 1987; JOHNSTON, 1990).

Estudos realizados em animais demonstraram que a administração oral de enalapril é capaz de inibir, em diferentes graus, a atividade da ACE presente no plasma e em outros tecidos (UNGER et al., 1985). Como resultado de tal inibição, verifica-se uma diminuição da concentração plasmática de angiotensina II, observando-se um aumento na atividade plasmática da renina, em consequência da supressão do "feedback" inibitório sobre a liberação desta enzima, bem como redução da concentração plasmática de aldosterona (CLAUSER et al., 1983; SCHIFFRIN et al., 1984; TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

A ação inibitória do enalapril sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona foi estudada tanto em indivíduos sadios como em pacientes com hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Os efeitos agudos observados após administração oral de enalapril caracterizaram-se por diminuição da concentração

plasmática de angiotensina II e aumento da concentração de angiotensina I, aumento da atividade plasmática de renina e decréscimo da concentração plasmática de aldosterona ou de sua excreção urinária. Tais alterações geralmente são mantidas durante tratamento prolongado, embora alguns estudos relatem que a concentração plasmática de aldosterona, neste caso, tende a retornar aos níveis observados antes do início do tratamento (GAVRAS et al., 1981; MacGREGOR et al., 1981; BRUNNER et al., 1983; HODSMAN et al., 1983; HODSMAN et al., 1984; JOHNSTON et al., 1984; SANCHEZ et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; CHATTERJEE & DE MARCO, 1990; TODD & GOA, 1992).

#### **1.1.2.2. Efeitos sobre o sistema calicreína-cinina-prostaglandina**

Alguns estudos sugerem a participação do sistema calicreína-cinina-prostaglandina e do sistema nervoso simpático no mecanismo de ação do enalapril (TODD & HEEL, 1986; CALÒ et al., 1991; TODD & GOA, 1992).

O efeito do enalapril sobre a excreção urinária de calicreína ainda permanece pouco preciso. Enquanto alguns autores indicam haver redução nas taxas de excreção, outros estudos relatam a inexistência de alterações significativas na excreção urinária de calicreína em pacientes hipertensos, submetidos à terapia prolongada ou após dose única de enalapril (MARRE et al., 1985; SANCHEZ et al., 1985; TODD & HEEL, 1986).

Uma vez que a ACE, também conhecida como cininase II, parece estar envolvida na metabolização do vasodilatador bradicinina, o aumento na atividade da cinina tem sido proposto como um possível mecanismo de ação do enalapril

(VLASSES et al., 1985; DZAU, 1990). Estudos *in vivo* indicam que enalapril e enalaprilato exercem efeito potenciador sobre a resposta depressora induzida por infusão de bradicinina em ratos e cães. Da mesma forma, as duas substâncias favorecem o aumento de edema induzido por injeção intraplantar de carragenina em ratos, sendo que tal processo inflamatório é mediado por bradicinina ou liberação de prostaglandina (SVOLMANIS & BOURA, 1983; UNGER et al., 1984). A administração oral de enalapril (5 a 10 mg) em pacientes hipertensos parece não produzir efeito clinicamente significativo sobre a bradicinina plasmática (CHATTERJEE & DE MARCO, 1990).

Embora existam relatos de aumento na excreção urinária de cininas, após administração de dose única de enalapril a pacientes hipertensos (SHIONOIRI et al., 1985), a quantificação de cininas em plasma ou urina é considerada tarefa difícil e pode não refletir os efeitos locais (VLASSES et al., 1985).

Mesmo estando claro que o enalapril pode potencializar os efeitos resultantes da administração de bradicinina exógena, muitos estudos não indicam a participação de cininas ou prostanóides endógenos nas alterações hemodinâmicas induzidas por enalapril (TODD & GOA, 1992).

Quanto às prostaglandinas, o enalapril não apresenta efeito significativo sobre a concentração plasmática de  $PGE_1$  ou  $PGE_2$  em pacientes hipertensos, após administração oral (LAROCHELLE et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; CHATTERJEE & DE MARCO, 1990). Embora alguns estudos relatem a inexistência de alterações nas concentrações urinárias de 6-ceto-PGF<sub>1</sub>, tromboxana B<sub>2</sub>,  $PGE_2$  ou PGF<sub>2</sub> (FITZ et al., 1982; VLASSES et al., 1983), estudo realizado após a administração oral de 40 mg/dia de enalapril, durante 4 semanas, revelou um aumento

significativo na excreção urinária de 6-ceto-PGF<sub>1</sub>, sendo que a administração concomitante de indometacina aboliu tal efeito (OPARIL et al., 1983; CHATTERJEE & DE MARCO, 1990). Estas controvérsias refletem a necessidade de estudos complementares, visando elucidar a possível participação das prostaglandinas no mecanismo de ação do enalapril.

### **1.1.2.3. Efeitos hemodinâmicos**

De acordo com os dados apresentados na literatura, os efeitos hemodinâmicos benéficos do enalapril resultam da inibição da ACE e da conseqüente redução nos níveis de angiotensina II, produzindo, direta ou indiretamente, dilatação dos vasos periféricos e redução da resistência vascular (TODD & HEEL, 1986; DZAU, 1990; TODD & GOA, 1992).

O enalapril diminui a pressão sanguínea inicialmente por decréscimo da resistência vascular periférica, apresentando pouco ou nenhum efeito sobre o débito cardíaco. Apesar da significativa redução na pressão arterial, a frequência cardíaca geralmente não sofre alterações, embora existam exceções relatadas na literatura (VLASSES et al., 1985; TODD & GOA, 1992).

Em indivíduos hipertensos, a administração de doses únicas de enalapril ( 5 a 40 mg) reduz a pressão sanguínea em cerca de 15 a 20% após 6 ou 8 horas. Todavia, a intensidade deste efeito é dependente do nível de hipertensão observado antes do início da terapia. Tal efeito parece ser dose-dependente até cerca

de 10 mg, sendo que doses mais elevadas resultam em aumento do tempo de duração do efeito para 24 - 36 horas (JACKSON et al., 1984; TODD & HEEL, 1986).

Os efeitos antiipertensivos do enalapril são mais pronunciados em indivíduos com depleção de sódio, os quais apresentam maior atividade de renina plasmática. Existem relatos de maior redução da pressão sanguínea em pacientes idosos em comparação a pacientes jovens, embora os baixos níveis de atividade de renina plasmática estejam normalmente associados com o avanço da idade (DAVIES et al., 1984; JACKSON et al., 1984; HOCKINGS et al., 1985; VLASSES et al., 1985; TODD & HEEL, 1986). Entretanto, estudo multicêntrico envolvendo 276 pacientes, 115 dos quais apresentavam idade superior a 60 anos, mostrou que o enalapril foi eficaz e bem tolerado tanto por pacientes jovens quanto por idosos (GAVRAS, 1990). O mesmo resultado foi obtido em estudo envolvendo 1.017 pacientes portorriquenhos com hipertensão essencial leve ou moderada (RUIZ & FELIU, 1990).

A utilização de enalapril no tratamento de pacientes hipertensos não parece ter efeito significativo sobre o volume de plasma, volume de sangue total ou sobre o peso corporal. Discreta natriurese, indicada por uma pequena elevação na excreção fracional de sódio, tem sido observada no início da terapia. Durante tratamento prolongado com enalapril, não associado a outros fármacos, observou-se decréscimo na concentração sérica de ácido úrico e um aumento marginal na concentração sérica de potássio. Tais alterações não apresentaram significância clínica, embora tenham sido relatados casos de hipercalemia em pacientes com insuficiência renal crônica pré-existente (VLASSES et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; WARNER & RUSH, 1988; GAVRAS, 1990).



Durante terapia antiipertensiva prolongada com enalapril, embora ocorra redução da resistência periférica total por diminuição da resistência de vasos e artérias, não foi observada a ativação de reflexos cardiovasculares compensatórios (DAVIES et al., 1984; VLASSES et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; FERRARIO, 1990).

Em pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda, a administração prolongada de enalapril pode levar à reversão do distúrbio, sem qualquer alteração na contratilidade do miocárdio (VLASSES et al., 1985; DZAU, 1990; TODD & GOA, 1992).

A utilização de agentes inibidores da ACE pode ser caracterizada como instrumento terapêutico importante no controle da insuficiência cardíaca congestiva (DZAU, 1990; POOLE-WILSON, 1990).

Em aproximadamente dois terços dos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, associada ou não a alterações da artéria coronária, observa-se um aumento da atividade plasmática de renina, o qual resulta em aumento na produção de angiotensina II. A elevação dos níveis deste peptídeo contribui de forma significativa para o aumento do tono vascular periférico nestes indivíduos. Além disso, estes pacientes geralmente apresentam aumento de demanda e consumo de oxigênio pelo miocárdio, resultante da elevação na tensão da parede ventricular direita. A utilização de agentes inibidores da enzima conversora de angiotensina, entre os quais o enalapril, produz alterações neuro-humorais benéficas para estes pacientes. Estas alterações caracterizam-se pela redução do tono simpático, dos níveis de aldosterona e angiotensina II, redução da resistência ventricular direita, da resistência vascular coronária, bem como redução na demanda e consumo de oxigênio pelo

miocárdio. Os efeitos benéficos observados com a administração de enalapril parecem apresentar vantagens clínicas em relação à utilização de outros tipos de vasodilatadores, tais como hidralazina e agentes bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos (CHATTERJEE & DE MARCO, 1990).

Em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva severa, submetidos à terapia com digitálicos e/ou diuréticos, a administração de enalapril (2,5 a 20 mg) pode reduzir a pressão arterial média, sendo que estudos recentes demonstraram que a inibição da enzima conversora de angiotensina é capaz de prolongar a expectativa de vida de indivíduos com insuficiência cardíaca avançada (TODD & HEEL, 1986; DZAU, 1990).

O emprego de enalapril no tratamento de pacientes diabéticos não dependentes de insulina e com hipertensão essencial leve ou moderada, parece não alterar a tolerância à glicose, caracterizando-se como opção terapêutica efetiva para o controle da hipertensão nestes indivíduos (ZANELLA et al., 1990). Da mesma forma, a administração de enalapril a pacientes hipertensos com diabetes do tipo II, resulta na diminuição da resistência vascular e aumento da capacidade máxima de vasodilatação arteriolar e da distensibilidade venosa, sendo que tais alterações hemodinâmicas são úteis no tratamento destes pacientes (STROCCHI et al., 1991).

Em pacientes com *diabetes mellitus*, dependente ou não de insulina, a ação antihipertensiva do enalapril, administrado isoladamente ou em associação com um diurético quando necessário, parece ser comparável àquela observada em pacientes não-diabéticos com hipertensão essencial (BARROS et al., 1991; CHAN et al., 1991; TODD & GOA, 1992).

A comparação dos efeitos do enalapril e do antagonista de cálcio nifedipina no tratamento de pacientes hipertensos obesos e com intolerância à glicose, demonstrou que ambas as substâncias apresentaram efeito antihipertensivo comparável, sem produzir alterações indesejáveis sobre o controle metabólico (ANDRONICO et al., 1991).

#### **1.1.2.4. Efeitos sobre a função renal**

Em indivíduos sadios e pacientes hipertensos com função renal normal, a utilização de enalapril geralmente resulta em elevação no fluxo sanguíneo e diminuição da resistência vascular renal. Nestes casos, não parece haver alteração no processo de filtração glomerular (DAVIES et al., 1984; TODD & HEEL, 1986).

Estudos em animais indicam que o enalapril, além de atuar sobre a hipertensão sistêmica e normalizar a pressão capilar glomerular, parece ser capaz de retardar a perda progressiva da função renal (MEYER et al., 1985; RAIJ et al., 1985).

O emprego de enalapril também parece melhorar o prognóstico de pacientes com glomerulonefrite associada a insuficiência renal crônica, mediante a manutenção dos índices de filtração glomerular, da diminuição da proteinúria e da pressão sanguínea, bem como alterando ou retardando a progressão natural da insuficiência renal (GAVRAS, 1990).

Entretanto, embora muitos estudos demonstrem existir uma correlação positiva entre a pressão sanguínea sistêmica e a velocidade de progressão de distúrbio renal em alguns pacientes, a avaliação dos efeitos da inibição da ACE

sobre tal processo tem fornecido resultados variáveis (MASCHIO et al., 1988; KLAHR, 1989; RUILOPE et al., 1989; OPSAHL et al., 1990; JAMIESON et al., 1991).

A terapia com agentes inibidores da ACE geralmente diminui a pressão sanguínea sistêmica, não altera a função renal e diminui a proteinúria em pacientes com insuficiência renal crônica. A redução na proteinúria parece ser variável e pode depender da hemodinâmica glomerular anterior ao tratamento e/ou da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Todavia, tanto a redução na proteinúria como a possível diminuição na velocidade de progressão da doença renal, não são observadas em todos os pacientes. Da mesma forma, não está claro se tais efeitos são exclusivos dos inibidores da ACE, uma vez que a diminuição da pressão sanguínea sistêmica com outras substâncias pode resultar em efeitos similares (OPSAHL et al., 1990).

Em pacientes diabéticos com nefropatia incipiente ou acentuada, observa-se um efeito antiproteinúrico benéfico durante a terapia antiipertensiva com enalapril. A nefropatia, avaliada através da albuminúria e proteinúria, parece ser atenuada significativamente nestes pacientes. Existem evidências de que o efeito antiproteinúrico induzido por enalapril é independente de seus efeitos antiipertensivos. Ao que parece, tal efeito pode estar relacionado com a influência do enalapril sobre a hemodinâmica renal, possivelmente devido à diminuição na pressão de filtração glomerular (BJÖRCK et al., 1990; TODD & GOA, 1992). Entretanto, embora alguns estudos indiquem melhoria da função renal durante terapia prolongada com enalapril em pacientes diabéticos hipertensos (MARTELLO et al., 1991; INSERRA et al., 1991), existem relatos de rápida deterioração da função renal após o início da terapia com enalapril em alguns pacientes (CHENG et al., 1990).

#### 1.1.2.5. Mecanismo de ação

O mecanismo exato do efeito antiipertensivo do enalapril não é conhecido (TODD & HEEL, 1986; USP DI, 1990).

Muitos estudos sustentam a hipótese de que os efeitos hemodinâmicos benéficos do enalapril resultam da inibição da ACE, com conseqüente redução dos níveis de angiotensina II, principalmente na musculatura vascular. Esta redução desencadeia um mecanismo contra-regulador, caracterizado pelo aumento dos níveis de renina e angiotensina I e diminuição dos níveis de aldosterona, embora a concentração plasmática desta última tenda a retomar aos níveis normais durante terapia prolongada com enalapril. A diminuição da concentração de angiotensina II resulta, direta ou indiretamente, na dilatação dos vasos periféricos, levando à redução da resistência vascular sistêmica e conseqüente diminuição da pressão sanguínea (TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

Além da ação sobre o sistema renina - angiotensina - aldosterona, alguns estudos sugerem que os efeitos hemodinâmicos do enalapril poderiam resultar também de sua atuação sobre as cininas vasoativas, prostaglandinas ou sobre o sistema nervoso simpático, embora algumas das observações apresentadas pareçam ser contraditórias (TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

### 1.1.3. Estudos farmacocinéticos

O enalapril pode ser considerado como um pró-fármaco, apresentando-se como o éster etílico do enalaprilato, inibidor ativo da ACE, o qual é pouco absorvido no trato gastrointestinal (PATCHETT, 1980; TOCCO et al., 1982; ULM, 1983; DAVIES et al., 1984; TODD & HEEL, 1986; IP & BRENNER, 1987; PELKONEN & YLITALO, 1989; TODD & GOA, 1992).

Após a absorção, o enalapril é rapidamente hidrolisado à forma de enalaprilato ativo. Este processo ocorre principalmente no fígado e, em menor grau, em outros tecidos. Não foi observado metabolismo posterior de enalapril ou enalaprilato no homem. Enalaprilato inalterado e uma pequena taxa de enalapril são excretados através dos rins (TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

O enalapril é rapidamente absorvido após administração oral, atingindo uma concentração plasmática máxima após cerca de 1 hora, a qual decresce rapidamente, desaparecendo no período de aproximadamente 4 horas. A concentração plasmática de enalaprilato atinge um máximo em torno de 3 a 4 horas após a administração de enalapril, decrescendo lentamente. Níveis significantes de enalaprilato podem ser encontrados 24 horas após uma dose única, sendo que a substância ainda pode ser detectada no plasma após um período de 96 horas (BIOLLAZ et al., 1982; ULM et al., 1982; TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

Dados obtidos a partir da recuperação urinária de enalapril e enalaprilato, indicam que a absorção do primeiro oscila entre 53 e 74%, após administração oral (ULM et al., 1982; DAVIES et al., 1984; TILL et al., 1984; TODD & GOA, 1992).

Tanto a absorção de enalapril como a biodisponibilidade de enalaprilato não parecem ser alteradas pela ingestão de alimentos (SWANSON et al., 1984; TODD & HEEL, 1986).

O enalaprilato apresenta uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas em torno de 50% (DAVIES et al., 1984; TODD & HEEL, 1986), cuja característica bifásica decorre, provavelmente, da interação com dois sítios de ligação (VLASSES et al., 1985; TODD & GOA, 1992). Ao que parece, um destes sítios apresenta baixa afinidade e alta capacidade, enquanto que outro possui elevada afinidade e baixa capacidade. Este último está aparentemente relacionado com a ligação da substância à ACE circulante (DAVIES et al., 1984; VLASSES et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992). Em concentrações menores do que 8 ng/mL predomina a interação com o sítio de alta afinidade, sendo que concentrações elevadas favorecem a ligação com o sítio de baixa afinidade (VLASSES et al., 1985).

Estudos recentes indicam que tanto enalapril como enalaprilato não são capazes de transpor a barreira hematoencefálica, nas doses terapêuticas empregadas (VLASSES et al., 1985; TODD & GOA, 1992). Entretanto, ambas as substâncias foram detectadas no leite materno, sendo que a administração de uma dose de 20 mg a uma mulher em período de lactação pode transferir ao lactente cerca de 2 µg da substância. Todavia, esta quantidade não parece ser suficiente para resultar em efeito farmacológico significativo (REDMAN et al., 1990). Por outro lado, a utilização de enalapril não deve ser recomendada durante a gestação, uma vez que já foram relatados casos de morte fetal e efeitos adversos graves em neonatos, indicando que enalapril e/ou enalaprilato são capazes de transpor a barreira placentária

em quantidade suficiente para produzir os efeitos acima citados (ROSA & BOSCO, 1991; TODD & GOA, 1992).

Dados obtidos a partir da administração de 10 mg de enalapril em indivíduos sadios, indicam que 33% da dose pode ser recuperada nas fezes ( 6% como enalapril e 27% como enalaprilato) e 61% de recuperação na urina ( 18% como enalapril e 43% como enalaprilato), sendo que a recuperação fecal representa a quantidade de substância não absorvida ou eliminada por excreção biliar (ULM et al., 1982; ULM, 1983; VLASSES, 1985; TODD & HEEL, 1987; TODD & GOA, 1992).

A excreção renal parece ser a principal via de eliminação, sendo que os valores médios do "clearance" renal para enalapril e enalaprilato estão em torno de 18 e 8 a 9,5 L/h, respectivamente. Os valores obtidos para enalaprilato sugerem que o processo de secreção tubular pode contribuir para a eliminação renal deste metabólito ( ULM et al., 1982; VLASSES et al., 1985; TODD & GOA, 1992).

Enquanto o enalapril apresenta um tempo de meia-vida para eliminação plasmática em torno de 2 horas, o enalaprilato possui uma cinética de eliminação bifásica, com uma fase terminal prolongada (TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992). Na fase inicial da eliminação, o tempo de meia-vida para enalaprilato é de aproximadamente 5 horas, sendo que na fase terminal este tempo pode oscilar entre 30 e 35 horas. A persistência desta última fase é decorrente da ligação de elevada afinidade com a ACE plasmática (VLASSES et al., 1985; TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

O "clearance" sistêmico de enalaprilato é reduzido em indivíduos com disfunção renal, podendo resultar em acumulação excessiva. Nestes casos, torna-



-se necessário a redução da dosagem. Da mesma forma, a concentração plasmática de enalaprilato pode estar aumentada em pacientes idosos e indivíduos diabéticos (TODD & GOA, 1992).

#### 1.1.4. Relação estrutura - atividade

O ponto de partida para o desenvolvimento de substâncias inibidoras da ACE, foi a reflexão de que esta enzima deveria apresentar um centro ativo similar àquele existente na carboxipeptidase A, uma vez que ambas as enzimas apresentam função semelhante. Assim sendo, a carboxipeptidase A poderia ser utilizada como modelo para a ACE. Embora estas duas enzimas apresentem diferentes especificidades, as pesquisas foram direcionadas para a obtenção de inibidores que refletissem o fato de que a carboxipeptidase A, tal como a ACE, é capaz de remover um dipeptídeo da cadeia terminal de uma proteína, preferencialmente à remoção de um aminoácido isolado (PATCHETT, 1984; AUTERHOFF et al., 1991).

A análise da carboxipeptidase, através de difração de raio X, evidenciou que o centro ativo da enzima apresenta um resíduo de arginina carregado positivamente, um resíduo de serina, o qual atua como doador para ponte de hidrogênio, bem como um complexo ligado ao cátion  $Zn^{++}$  (AUTERHOFF et al., 1991). Ao que parece, o átomo de zinco desempenha um papel importante na hidrólise da ligação peptídica, possivelmente por polarização do grupo carbonila da ligação passível de ruptura (PATCHETT, 1984). Resíduos de tirosina e ácido glutâmico também participam do rompimento enzimático da ligação peptídica (AUTERHOFF et al., 1991). A ligação de

um peptídeo no centro ativo da ACE poderia ser representada segundo o modelo indicado na figura 4.

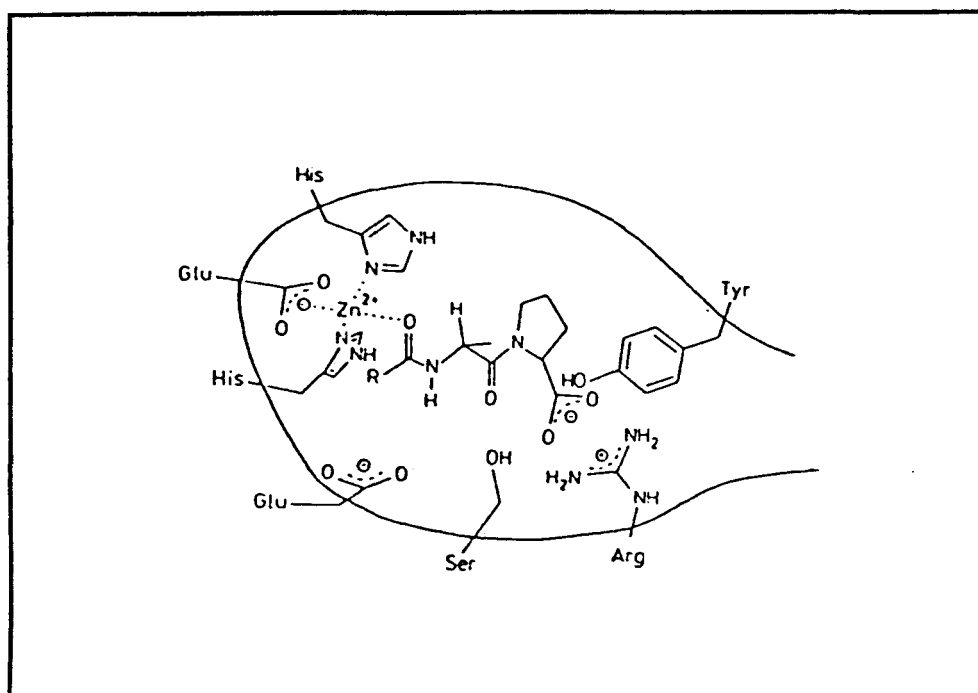


Figura 4: Ligação de um peptídeo com o centro ativo da ACE

A enzima conversora de angiotensina pode ser inibida competitivamente, através da ligação de um derivado peptídico ao centro ativo da enzima. As substâncias que possuem uma ligação peptídica de difícil ruptura, apresentam maior efeito inibidor, uma vez que são capazes de ligar-se fortemente ao

centro ativo da enzima, desencadeando uma inibição competitiva duradoura (AUTERHOFF et al., 1991).

A comparação entre as estruturas apresentadas na figura 5, indica que os inibidores da ACE geralmente são dipeptídeos ou possuem uma grande semelhança com dipeptídeos, ou seja, apresentam pelo menos dois aminoácidos em sua estrutura. Alguns destes inibidores são estruturalmente semelhantes ao aminoácido (S)-prolina, sendo que alguns possuem anel de seis membros ou sistema de anéis condensados. Porém, todos apresentam o átomo de carbono da posição 2 em configuração (S) (OTTO, 1989).

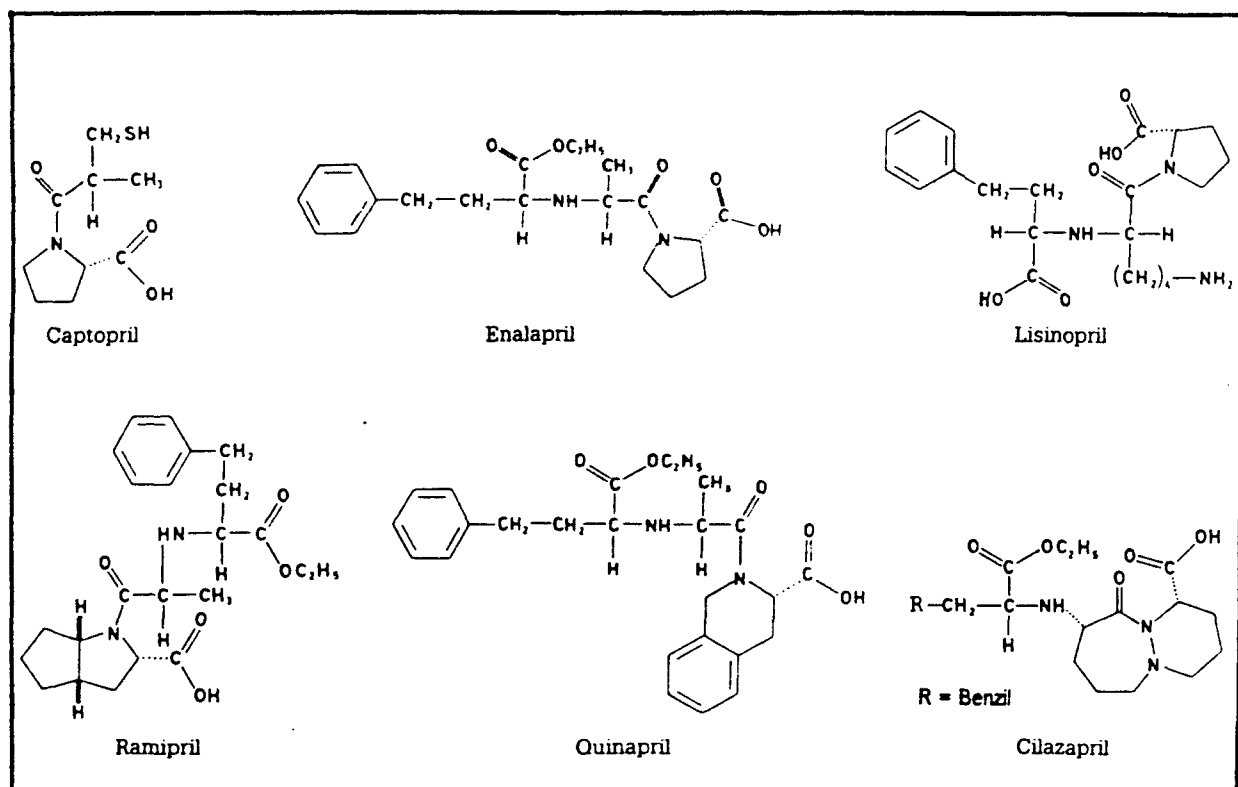
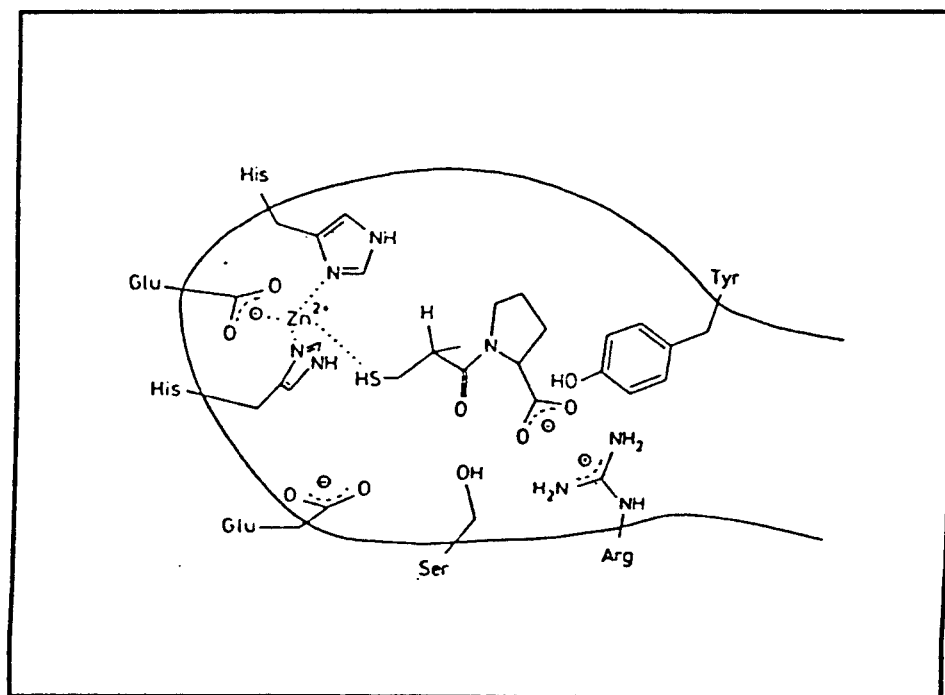


Figura 5: Estruturas químicas de alguns inibidores da ACE.

O primeiro agente inibidor da ACE a estar disponível comercialmente foi o captopril (Figura 5), cuja estrutura resulta da união do aminoácido (S) - prolina com o ácido (S)- 3- mercapto- 2 - metil - propiônico, através de ligação do tipo amida. A ligação do captopril à ACE ocorre por interação da prolina com o final do centro ativo, sendo que o grupo sulfidríla parece ser responsável pela ligação ao cátion  $Zn^{++}$ . A ligação é estereoespecífica, sendo que o diastereoisômero com configuração do ácido (R) - propiônico tem ação 100 vezes menos potente do que o diastereoisômero (S) (AUTERHOFF et al., 1991). Entretanto, embora todos os derivados estruturais do captopril apresentem ao menos um centro de quiralidade em configuração (S), é discutível se esta característica poderia ser considerada essencial para a ligação ao centro ativo da ACE (OTTO, 1989). A figura 6 apresenta um modelo esquemático da ligação do captopril com a enzima conversora de angiotensina (ACE).



**Figura 6:** Ligação do captopril com o sítio ativo da ACE

O enalapril é considerado um pró-fármaco, cuja potência inibitória sobre a ACE é cerca de 1000 vezes menor do que o seu metabólito enalaprilato. Como foi mencionado anteriormente, o enalaprilato foi a substância originalmente sintetizada. A obtenção de seu éster etílico, como sal do ácido maleico (enalapril), foi decorrente da necessidade de melhorar sua absorção oral. Como o enalapril, *in vivo*, é rapidamente hidrolisado à forma de enalaprilato ativo, cabe aqui ressaltar as características estruturais diretamente relacionadas com a atividade deste último.

Tanto enalapril como enalaprilato são inibidores da ACE, obtidos a partir de estudos sistemáticos de derivados carboxialquil-substituídos de dipeptídeo contendo alanina e prolina, cuja fórmula estrutural geral está apresentada na figura 7 (PATCHETT, 1984).

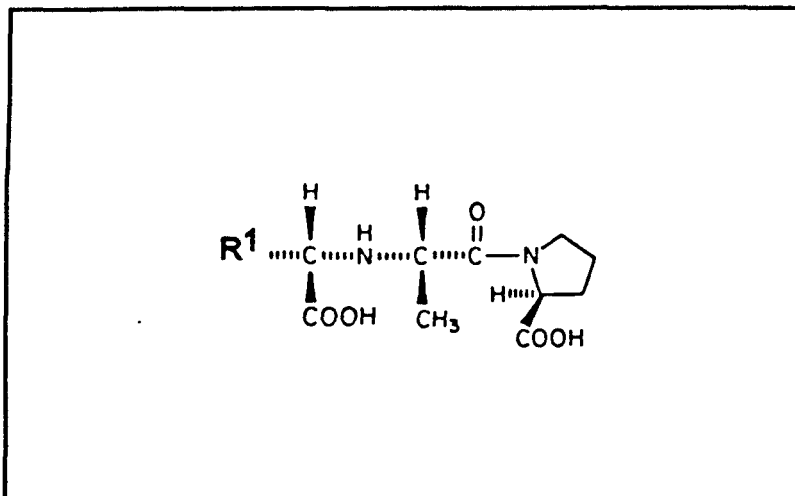


Figura 7: Estrutura geral dos dipeptídeos inibidores da ACE.

A substituição de  $R^1$  por grupos hidrofóbicos forneceu aumento significativo da potência inibitória sobre a ACE, mesmo utilizando-se uma mistura de

diastereoisômeros. A maior atividade foi obtida em compostos contendo grupos anilalquila, tal como o grupo fenetila, presente na estrutura do enalaprilato. Esta observação está em acordo com a hipótese de que o grupamento  $R^1$  interage com um sítio denominado  $S_1$  no centro ativo da enzima, conforme indicado na figura 8 (PATCHETT, 1984; OTTO, 1989).

Comparando-se o efeito inibitório de captopril e enalaprilato sobre a ACE, verificou-se que a potência deste último é significativamente superior, indicando que uma forte ligação com o átomo de zinco não é essencial para uma inibição potente, uma vez que o poder de ligação do enalaprilato com este cátion é geralmente o mesmo observado com outros  $\alpha$ -aminoácidos (PATCHETT et al., 1980; ULM, 1983).

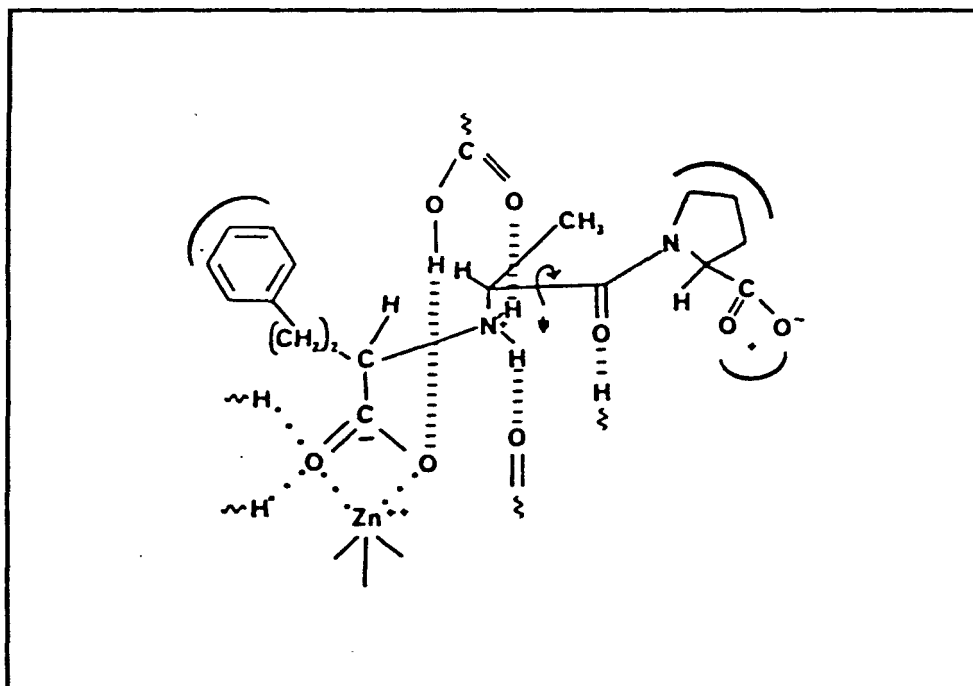


Figura 8: Interação do enalaprilato com o sítio ativo da ACE.

A análise conformacional do enalaprilato, realizada através de cristalografia de raio-X, forneceu dados importantes quanto ao efeito de restrições conformacionais sobre sua atividade inibitória. A ligação amida da prolina está em configuração *trans*, significando que o oxigênio carbonílico e os grupos carboxila são *syn* um em relação ao outro. Estes dados foram utilizados como base para estudos posteriores, os quais levaram à conclusão de que uma porção da molécula do enalaprilato, formada por alanina e prolina, liga-se a ACE numa conformação muito semelhante àquela verificada em sua estrutura cristalina ( $\psi = 143^\circ$ ). Como esta conformação corresponde ao estado de menor energia, o enalaprilato deve ligar-se à ACE com uma alteração conformacional mínima, pelo menos no que diz respeito à porção da estrutura relacionada a alanina e prolina. O fato de que uma energia de ligação muito pequena seria necessária para ajustar a conformação do enalaprilato, possivelmente contribui para sua elevada potência inibitória sobre a ACE (PATCHETT, 1984). A Figura 9 apresenta a estrutura do enalaprilato, determinada por cristalografia de raio-X.

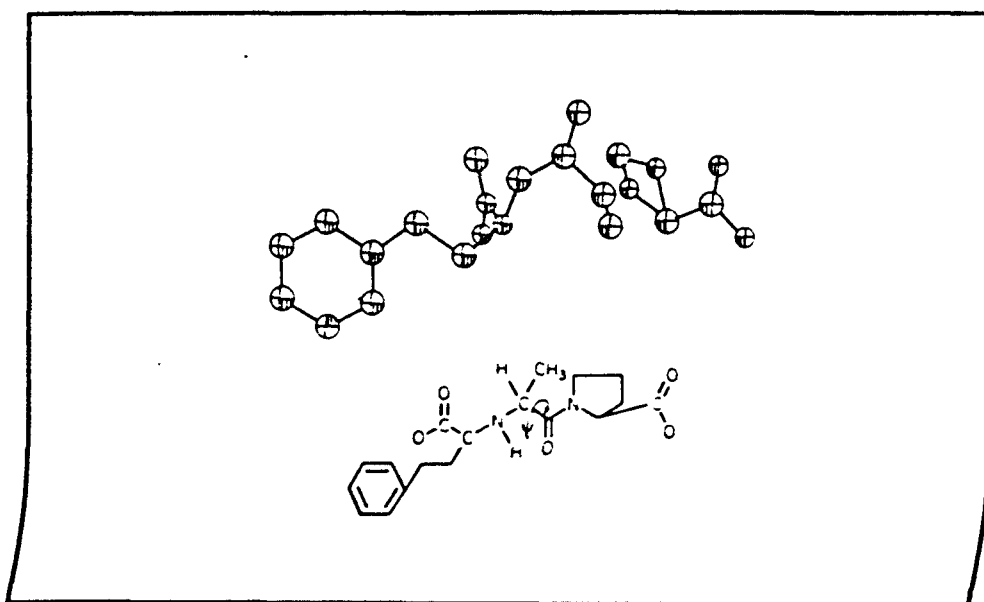


Figura 9: Estrutura do enalaprilato, determinada por cristalografia de raio-X.

### 1.1.5. Efeitos adversos

Embora a introdução dos agentes inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) no tratamento da hipertensão seja fato relativamente recente, a experiência clínica acumulada demonstra que, nas doses geralmente indicadas, o perfil de segurança e tolerabilidade destes agentes pode ser comparado favoravelmente com o de outras substâncias empregadas na terapia antiipertensiva (WARNER & RUSH, 1988).

Estudos realizados com pacientes submetidos à terapia com enalapril indicam que reações adversas graves, relacionadas diretamente com a substância, constituem-se em episódios raros, sendo que tais intercorrências apresentam frequência similar àquela observada em pacientes tratados com placebo (TODD & HEEL, 1986; WARNER & RUSH, 1988; TODD & GOA, 1992).

Os efeitos adversos mais comumente observados em pacientes hipertensos sob tratamento com enalapril incluem cefaléia, discinesia, fadiga, diarreia, náuseas, erupções cutâneas, tosse e hipotensão (McFATE et al., 1984; TODD & HEEL, 1986; WARNER & RUSH, 1988; TODD & GOA, 1992).

Entre os efeitos adversos graves, registrados durante a terapia com enalapril, embora raros, pode-se incluir angina, taquicardia, infarto do miocárdio, acidente cerebrovascular, síncope, insuficiência ventricular direita, insuficiência cardíaca, dispnéia, taquipnéia e broncoespasmo. Todavia, tais registros devem ser caracterizados como provável ou possivelmente relacionados com o uso de enalapril (COOPER et al., 1987; TODD & GOA, 1992).



A mortalidade registrada entre pacientes tratados com enalapril durante 3 ou 4 anos é comparável àquela observada em pacientes tratados com outros agentes antiipertensivos, sendo que não são relatados óbitos atribuídos diretamente ao enalapril (TODD & HEEL, 1986; PALMER et al., 1990).

A tosse é talvez o efeito adverso mais incômodo associado com enalapril, e da terapia com agentes inibidores da ACE em geral, sendo frequentemente responsável pela interrupção do tratamento (WARNER & RUSH, 1988; TODD & GOA, 1992). Embora seja difícil determinar a incidência precisa deste efeito, estima-se que a frequência de tosse induzida por enalapril esteja em torno de 6 a 12%, com uma percentagem de interrupção do tratamento em torno de 6% (YEO et al., 1991; TODD & GOA, 1992). A etiologia desta tosse permanece imprecisa, embora alguns estudos sugiram que este efeito pode resultar do efeito do enalapril, e de modo geral dos inibidores da ACE, sobre a produção local de bradicinina e prostaglandina, o que levaria a um aumento da resposta inflamatória a nível pulmonar em indivíduos susceptíveis (WARNER & RUSH, 1988; TODD & GOA, 1992). Entretanto, a ocorrência de tosse durante o tratamento de pacientes hipertensos com asma e outros estados respiratórios alérgicos, parece apresentar frequência similar àquela observada na população em geral (KAUFMAN et al., 1992). A tosse não parece estar associada ao hábito de fumar, com a duração do tratamento ou com a dose utilizada, sendo que este efeito parece ser mais frequente em mulheres do que em homens (WARNER & RUSH, 1988; YEO et al., 1991; TODD & GOA, 1992). Estudos em animais sugerem que a utilização de diuréticos poderia reduzir a tosse associada ao tratamento de pacientes hipertensos com enalapril (KAMEI & KASUYA, 1992).

Hipotensão, algumas vezes sintomática, pode ocorrer 3 ou 4 horas após o início da terapia com enalapril e outros inibidores da ACE, principalmente em pacientes hipertensos ou com insuficiência cardíaca congestiva em tratamento com diuréticos (TODD & HEEL, 1986; OSTER et al., 1992). Além de terapia prévia com estes últimos agentes, dietas com restrição de sal, diálise, diarreia e vômitos são fatores que aumentam a possibilidade de desenvolvimento de hipotensão (WARNER & RUSH, 1988; TODD & GOA, 1992).

Embora os efeitos dos inibidores da ACE sobre a função renal sejam complexos, sabe-se que a utilização de enalapril pode resultar em insuficiência renal aguda em pacientes com estenose unilateral ou bilateral da artéria renal. Estudos recentes sugerem que este efeito parece estar relacionado com a diminuição do volume de líquidos, associada à hipercalemia em pacientes sob terapia com diuréticos poupadores de potássio (TODD & HEEL, 1986; WARNER & RUSH, 1988; WYNCKEL et al., 1991; TODD & GOA, 1992).

Dentre os efeitos cutâneos observados com o uso de enalapril, o desenvolvimento de angioedema pode ser considerado como o mais sério, ocorrendo geralmente no início da terapia e apresentando uma incidência que varia de 0,03 a 0,1% (COOPER et al., 1987; TODD & GOA, 1992), existindo relatos de que tal incidência pode chegar a 0,2% dos pacientes (WOOD et al., 1987). Embora o angioedema seja geralmente pouco intenso, pode representar risco de vida se houver obstrução das vias aéreas superiores. Neste caso, torna-se necessário o emprego de terapias de apoio, tais como suporte respiratório e injeção subcutânea de epinefrina (WARNER & RUSH, 1988; HEDNER et al., 1992; TODD & GOA, 1992). O mecanismo envolvido na ocorrência de angioedema durante a terapia com inibidores da ACE não é conhecido. Entretanto,

pacientes com deficiências em enzimas responsáveis pela degradação de bradicinina podem apresentar maior propensão ao desenvolvimento de reações do tipo angioedema, quando em tratamento com inibidores da ACE (HEDNER et al., 1992).

Urticária, eritema e erupção maculopapular, de pouca intensidade, podem ocorrer em cerca de 1% dos pacientes, sendo que raros casos de dermatite esfoliativa e prurido vulvovaginal foram relatados (TODD & GOA, 1992). Em geral, estes efeitos desaparecem após a interrupção do tratamento (TODD & HEEL, 1986).

Estudos em animais indicam que o enalaprilato, metabólito ativo do enalapril, é capaz de aumentar a resposta inflamatória cutânea induzida por ovoalbumina, bem como as respostas inflamatórias causadas por injeção intradérmica de alérgeno e substância P. Segundo estes resultados, o enalaprilato pode ser caracterizado como uma substância pró-inflamatória, possivelmente por atuar sobre o metabolismo de mediadores da inflamação como histamina e substância P (ANDERSSON et al., 1991). Todavia, estudo recente não indica qualquer influência do enalapril sobre as respostas teciduais à substância P ou à neurocinina A, após injeção intradérmica em indivíduos sadios (FERNER et al., 1991).

A utilização de agentes inibidores da ACE durante a gestação parece resultar em hipotensão fetal. Existindo uma redução na perfusão placentária, como no caso de estados hipertensivos da gravidez, o emprego destes agentes pode comprometer de forma significativa o fluxo sanguíneo uteroplacentário. Alguns estudos têm associado o uso de inibidores da ACE com a ocorrência de anúria neonatal, insuficiência renal, retardamento do crescimento intrauterino, anormalidades cranianas fetais e síndrome de distresia respiratória (HENNESSY & HORVATH, 1992).

### 1.1.6. Interações medicamentosas

A utilização de enalapril deve ser cuidadosa em pacientes recebendo suplementação de potássio ou em terapia com ciclosporina ou diuréticos poupadores de potássio, especialmente em indivíduos com deficiência renal, devido à possibilidade de desenvolvimento de hipercalemia (VLASSES et al., 1985; USP DI, 1990; WYNCKEL et al., 1991).

Embora a administração concomitante de ciclosporina e enalapril não afete a concentração sanguínea de ciclosporina, existem indicações de que a vasoconstrição aferente induzida por esta última pode resultar em insuficiência renal aguda induzida por enalapril (TODD & GOA, 1992).

É possível ocorrer interação farmacodinâmica entre enalapril e outras substâncias capazes de afetar a pressão sanguínea, tais como outros agentes antiipertensivos, nitratos, álcool e anestésicos. Entretanto, além dos efeitos aditivos sobre a pressão sanguínea, não parece haver contra-indicação ao uso de enalapril com outros fármacos antiipertensivos (VLASSES et al., 1985).

O efeito antiipertensivo do enalapril pode ser potenciado por hidroclorotiazida, propranolol, timolol e  $\alpha$ -metildopa, sendo que a administração concomitante de enalapril e propranolol pode resultar em pequena redução da biodisponibilidade do primeiro e pequena elevação da biodisponibilidade do segundo (TODD & HEEL, 1986).

A utilização concomitante de enalapril e antiinflamatórios não-esteróides, especialmente indometacina, pode resultar na redução dos efeitos antiipertensivos dos agentes inibidores da ACE. Este efeito antagônico decorre da

inibição exercida pela indometacina, e possivelmente por outros antiinflamatórios não-esteróides, sobre a síntese de prostaglandina e/ou estímulo à retenção de sódio. Os pacientes submetidos à terapia com estes agentes devem ser adequadamente monitorados, com o objetivo de confirmar a obtenção dos efeitos desejados (USP DI, 1990).

Não foi verificada a existência de interação farmacocinética entre enalapril e furosemida, hidroclorotiazida, hidralazina, digoxina, nicardipina ou propranolol (TODD & HEEL, 1986; TODD & GOA, 1992).

O pré-tratamento com cimetidina não afeta as propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas do enalapril em indivíduos sadios, sugerindo que a cimetidina não altera a atividade da esterase hepática sobre o enalapril (TODD & GOA, 1992).

#### **1.1.7. Análise e quantificação do maleato de enalapril**

LINDA, em 1981, relatou a determinação quantitativa de compostos em metilcelulose aquosa através de cromatografia líquida em fase reversa, entre os quais o enalapril.

Em 1982, TOCCO e colaboradores relataram estudo da disposição fisiológica e metabolismo do maleato de enalapril em animais de laboratório, visando o estabelecimento de protocolos adequados para sua utilização no homem. Foram empregados os métodos de radioimunoensaio e avaliação do grau de inibição da enzima

conversora de angiotensina (ACE), através de fluorometria. Os níveis de radioatividade foram determinados em amostras de plasma, urina e fezes, através de espectrômetro de cintilação líquida, utilizando-se padronização externa. Para estes experimentos, empregou-se maleato de enalapril- $^{14}\text{C}$ , o qual foi sintetizado com a presença de  $^{14}\text{C}$  no anel prolina, com uma atividade de 9,05  $\mu\text{Ci/mg}$  e radiopureza de 99%.

Para os ensaios de inibição enzimática por fluorometria, o enalapril foi previamente convertido a enalaprilato por hidrólise alcalina. A concentração de enalapril foi determinada como sendo a diferença entre os valores obtidos para o inibidor total (enalapril + enalaprilato) após a hidrólise e inibidor livre (enalaprilato) nas amostras biológicas.

Em breve revisão sobre a absorção, disposição e metabolismo do maleato de enalapril no homem, ULM (1983) apresentou dados comparativos entre dois métodos utilizados para a quantificação desta substância e de seu metabólito ativo. O primeiro destes métodos foi descrito detalhadamente por TOCCO e colaboradores (1982) e baseia-se na capacidade do enalaprilato em inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina. O segundo método, utilizando a técnica de radioimunoensaio, é considerado específico para estruturas relacionadas ao enalaprilato. Neste caso, o antígeno utilizado foi obtido a partir do análogo MK-521 ( [ N-(1-S-carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil-L-prolina ] ). Segundo o autor, o método por radioimunoensaio apresenta maior sensibilidade em relação àquele baseado na inibição enzimática.

Desde a introdução do maleato de enalapril como agente antiipertensivo, a cromatografia líquida de alta eficiência ( CLAE ) foi considerada como o método mais prático para a quantificação desta substância em preparações

farmacêuticas, sem a interferência dos produtos de degradação (IP & BRENNER, 1987; SIDHU et al., 1987; OKLOBDZIJA et al., 1988). Entretanto, condições severas como o baixo pH do solvente e a elevada temperatura, tendem a diminuir a vida útil das colunas (KATO, 1985).

Como alternativa ao emprego de CLAE, KATO (1985) sugeriu a utilização de espectrofotometria de fluxo, usando a técnica de pareamento iônico com azul de bromotimol, para a determinação quantitativa do maleato de enalapril em medicamentos. Segundo dados apresentados pelo autor, o enalapril em solução aquosa (1,5 a 60,0 µg/mL) é extraído com diclorometano, sob a forma de seu par iônico com azul de bromotimol, em um sistema fechado e pode ser quantificado espectrofotometricamente. Cerca de 80 amostras podem ser processadas por hora, com desvio padrão relativo entre 1,0 e 3,4%. Os produtos de degradação e os excipientes da formulação não interferem na quantificação. No estudo em questão, o método proposto foi aplicado à análise de comprimidos contendo maleato de enalapril, sendo que os resultados foram comparados àqueles obtidos por CLAE. Neste último método, foi utilizada mistura de ácido fosfórico:metanol (1 : 1 v/v) pH 2,0 como fase móvel e coluna Hewlett-Packard RP-8, mantida à temperatura de 80 °C. O comprimento de onda utilizado para detecção foi 215 nm. De acordo com as observações do autor, o método proposto pode ser utilizado para a avaliação da estabilidade do enalapril, bem como para o controle de qualidade de formas farmacêuticas que o contenham, uma vez que apresenta vantagens sobre a cromatografia líquida de alta eficiência.

Visando confirmar a existência de formas polimórficas do maleato de enalapril, bem como estabelecer a relação termodinâmica entre os possíveis

polimorfos, IP e colaboradores (1986) descreveram a utilização de espectroscopia de alta resolução e estudos de calorimetria.

Considerando que o enalaprilato é o metabólito farmacologicamente ativo do enalapril e que a concentração plasmática deste último pode ser determinada indiretamente, WORLAND & JARROTT (1986) desenvolveram técnica de radioimunoensaio para a quantificação de enalaprilato no plasma.

Avaliando o efeito da umidade sobre a estabilidade física e química de granulados e comprimidos de maleato de enalapril, SHIROMANI & BAVITZ (1986) submeteram as amostras, acondicionadas em placas de Petri abertas, a diferentes umidades relativas e executaram a quantificação da umidade agregada. Utilizando o artifício da extrapolação, os autores estabeleceram as umidades relativas críticas para granulados e comprimidos contendo 10 e 40 mg de maleato de enalapril, nas condições experimentais adotadas. Segundo os autores, o maleato de enalapril apresentou-se razoavelmente estável, considerando-se os procedimentos de estocagem adotados. A dureza dos comprimidos diminuiu em todas as umidades relativas empregadas, exceto quando estocados com gel de sílica. Os tempos de desintegração não sofreram alteração, à exceção daquelas amostras submetidas a elevadas umidades. O perfil de dissolução dos comprimidos permaneceu inalterado.

SIDHU e colaboradores, em 1987, relataram o desenvolvimento de método simplificado para a análise rotineira de formulações farmacêuticas através de CLAE, utilizando coluna Bondapack C<sub>18</sub> em fase reversa, com um sistema binário de solvente, sendo que o comprimento de onda estabelecido para detecção foi 214 nm. O maleato de enalapril foi quantificado através do método proposto, tanto sob forma de matéria-prima como produto acabado. Para a quantificação em comprimidos, foi



executado um processo de extração prévio, definido pelos autores como "método 1". Entretanto, mesmo após a revisão de todos os dados apresentados, não foi possível identificar o significado preciso de tal convenção, uma vez que esta informação foi omitida.

Ainda em 1987, IP & BRENNER, em monografia sobre o maleato de enalapril, apresentaram dados que compreendem a descrição, síntese, propriedades físicas, métodos de análise, estabilidade e degradação, farmacocinética e metabolismo, bem como determinação da substância em fluidos biológicos. Quanto ao controle de qualidade, cabe ressaltar a importância dos dados referentes à espectroscopia na região do infravermelho, atividade ótica, análise espectrométrica, cromatografia em camada delgada e CLAE, análise térmica diferencial e doseamento físico-químico da referida substância. Entretanto, é importante salientar que algumas das informações apresentadas pelos autores estão referenciadas como "comunicações pessoais", o que torna difícil a avaliação e/ou tentativa de reprodução de alguns dos experimentos realizados. Tal dificuldade assume maiores proporções ao considerar-se que o levantamento bibliográfico realizado para a composição do presente trabalho, cuja pesquisa compreendeu o período entre 1977 e 1992, não indicou a existência de publicações que suportem alguns dos dados apresentados como "comunicação pessoal".

Em estudo sobre as características analíticas e físico-químicas do enalapril, OKLOBDIZIJA e colaboradores (1988) relataram a utilização de cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, doseamento em meio não aquoso e métodos espectroscópicos para a identificação e/ou quantificação do maleato de enalapril em formulações farmacêuticas. Todavia, quanto ao método de doseamento

em meio não aquoso citado pelos autores, houve variabilidade acentuada dos teores percentuais obtidos. Quanto à quantificação por CLAE, os autores utilizaram coluna LiChrosorb RP 18 e ácido perclórico 0,005 mol/L em uma mistura de metanol/água (57:43 v/v) como fase móvel ( pH 3,5 ), sendo que a determinação foi executada à temperatura de 25 °C. Entretanto, nestas condições, os cromatogramas obtidos apresentaram dois picos para enalapril (base), com tempos de retenção bastante próximos, resultantes da separação dos respectivos isômeros.

A Farmacopéia Americana, em sua 22ª edição (1990) preconiza a utilização de CLAE para a determinação quantitativa do maleato de enalapril, tanto em comprimidos como na matéria-prima. Para o ensaio da matéria prima, a fase móvel indicada é uma mistura de tampão fosfato de sódio, com pH ajustado para 6,8 pela adição de volume suficiente de solução de hidróxido de sódio, e acetonitrila (4:1), em proporções volumétricas, utilizando-se coluna contendo co-polímero esférico estireno-divinilbenzeno, submetida à temperatura de 70 °C, sendo a detecção realizada no comprimento de onda 210 nm. Para o ensaio com comprimidos, a referida Farmacopéia preconiza a utilização de uma mistura de tampão fosfato de potássio, com pH ajustado para 2,0 com o auxílio de solução de ácido fosfórico, e acetonitrila ( 17 : 8 ), em proporções volumétricas. A coluna indicada, contendo octilsilano, deve ser mantida à temperatura de 80°C, sendo a detecção realizada no comprimento de onda 215 nm.

Sabendo que o maleato de enalapril pode originar dois ou mais picos quando submetido à separação por cromatografia líquida em fase reversa, SALAMOUN & SLAIS (1991) avaliaram a possibilidade de eliminação de tal separação. Os autores concluíram que a diminuição no pH da fase móvel, o aumento na temperatura da coluna e/ou adição de agentes de pareamento iônico podem eliminar a

separação dos picos e melhorar significativamente a sua forma. Segundo os resultados apresentados, um pico com características ideais pode ser obtido utilizando-se fase móvel com pH baixo e coluna submetida a temperatura de 60 °C.

**II - MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1. MATERIAIS

### 2.1.1. Produto farmacêutico

Trabalhou-se com comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril, adquiridos no mercado brasileiro, no mês de agosto de 1991, provenientes do laboratório Merck Sharp & Dohme, sob o nome comercial RENITEC<sup>®</sup>.

As especificações dos comprimidos utilizados são as seguintes:

- Lote número ..... 91061381
- Data de fabricação ..... junho de 1991
- Prazo de validade ..... junho de 1993
- Acondicionamento:

Caixa com 30 comprimidos de 20 mg, em fita aluminizada medindo 6,6 cm x 15,1 cm e contendo 10 comprimidos. Os nomes comercial, genérico e do laboratório produtor foram impressos em cor preta sobre a fita aluminizada.

- Fórmula unitária:

A tabela 1 apresenta a composição unitária fornecida pelo laboratório produtor.

**Tabela 1:** Fórmula unitária da forma farmacêutica em estudo

MATÉRIAS-PRIMAS	QUANTIDADE (mg)
Maleato de enalapril	20,00
Carbonato de sódio	10,00
Lactose	146,70
Amido de milho	22,00
Óxido amarelo de ferro	0,13
Estearato de magnésio	1,10

**2.1.2. Padrão<sup>1</sup>**

Utilizou-se maleato de enalapril<sup>2</sup>, identificado pelo número de lote TLA 0041 e com teor de 100%.

<sup>1</sup> Gentilmente cedido pelo laboratório Merck Sharp & Dohme, na pessoa do Prof. Dr. Joaquim Prado Pinto de Moraes Filho.

<sup>2</sup> Laudo de análise emitido por Compagnie Chimique Merck Sharp & Dohme, Usine de La Valle, Brives-Charensac.

### 2.1.3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados, exceto quando especificado, foram de grau pró-análise.

- Acetato de etila (MERCK)
- Acetato de sódio (MERCK)
- Acetona (REAGEN)
- Acetonitrila, HPLC (MERCK)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Ácido clorídrico (MERCK)
- Ácido sulfúrico (MERCK)
- Álcool butílico normal (MERCK)
- Azul de bromotimol (MERCK)
- Cloreto de ferro III (MERCK)
- Cloreto de NBD (ALDRICH)
- Cloridrato de hidroxilamina (MERCK)

- Clorofórmio (REAGEN)
- Diclorometano (MERCK)
- Etanol (REAGEN)
- Fosfato de potássio (MERCK)
- Hidróxido de sódio (REAGEN)
- Metanol (REAGEN)
- o-Ftaldialdeído (ALDRICH)
- Sulfato cúprico pentaidratado (MERCK)

#### **2.1.4. Aparelhos e equipamentos**

- Agitador mecânico de garras TECNAL, modelo TE 244
- Aparelho para determinar a dureza de comprimidos SCHLEUNIGER
- Balança analítica SARTORIUS, modelo 2842
- Banho-maria BIOMATIC
- Bomba de vácuo PRIMAR



- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, composto por duas bombas WATERS 510, controlador de gradiente WATERS 680, injetor manual RHEODYNE com alça doseadora de 20  $\mu$ l, detector espectrofotométrico WATERS 484 e módulo de tratamento de dados WATERS 746.
- Desintegrador ÉTICA de agitação mecânica pendular, 30 movimentos/minuto
- Espectrofotômetro UV/VIS VARIAN, série 634, com registrador modelo 261
- Espectrofotômetro infravermelho PERKIN ELMER, modelo 1310
- Evaporador rotatório BÜCHI.
- Fluorômetro TURNER, modelo 111
- Friabilômetro ROCHE, velocidade 20 rpm
- Lâmpada Universal de Quartzo Fluotest
- Microscópio para ponto de fusão tipo KOEFLER
- Paquímetro MITUTOYO-TOTIGI
- Polarímetro
- Potenciômetro digital METRONIC ED 3
- Titulador de Karl Fischer METROHM HEISAN, modelo E-551 e multibureta METROHM HEISAN, modelo E-485

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Análise físico-química das amostras**

#### **2.2.1.1. Caracteres organolépticos**

Determinaram-se as características organolépticas dos comprimidos, examinando-os aleatoriamente.

#### **2.2.1.2. Dimensões**

Determinaram-se a largura, espessura e comprimento de 30 comprimidos, com o auxílio de paquímetro.

#### **2.2.1.3. Peso médio**

Pesaram-se, individualmente, 30 comprimidos, escolhidos aleatoriamente. Utilizou-se balança analítica e determinou-se a média segundo a F. Bras. IV.

#### **2.2.1.4. Friabilidade**

Determinou-se a friabilidade de 30 comprimidos, utilizando-se o friabilômetro numa velocidade de 20 rpm, durante 5 minutos, segundo a F. Bras. IV.

#### **2.2.1.5. Dureza**

Determinou-se a resistência à compressão radial de 20 comprimidos, utilizando-se o aparelho especificado no item 2.1.4., segundo a F. Bras. IV.

#### **2.2.1.6. Desintegração**

Determinou-se a desintegração em água, mantida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para 6 comprimidos, utilizando-se o aparelho especificado no item 2.1.4., segundo a F. Bras. IV.

#### **2.2.1.7. Umidade**

Em balança analítica, pesaram-se individualmente 20 comprimidos e determinou-se o respectivo peso médio. Os comprimidos foram triturados em gral de porcelana. Pesaram-se três amostras equivalentes ao peso médio e determinou-se a umidade, empregando-se o método volumétrico direto em titulador de Karl Fischer, segundo especificações da F. Bras. IV.

#### **2.2.1.8. Identificação do maleato de enalapril**

Procedeu-se à identificação do maleato de enalapril segundo descrito por IP & BRENNER (1987) e OKLOBDIZIJA et al. (1988).

#### 2.2.1.8.1. Extração da substância ativa

Trituraram-se 20 comprimidos em gral de porcelana, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, o qual permaneceu sob agitação mecânica durante 30 minutos, juntamente com 25 mL de metanol. Após o período de agitação, filtrou-se através de papel Whatman 40, descartando-se os primeiros 5 mL do filtrado. A fração metanólica foi submetida à evaporação, em evaporador rotatório e sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspenso em 10 mL de acetona e, após evaporação sob corrente de ar quente, obtiveram-se cristais brancos, os quais foram submetidos à secagem em estufa a 25 °C, sob vácuo, durante 48 horas.

#### 2.2.1.8.2. Cromatografia em camada delgada

As cromatoplasmas foram preparadas em laboratório, empregando-se como fase estacionária gel de sílica GF<sub>254</sub> nm, de procedência Merck, suspenso em água e distribuído sobre placas de vidro (20 cm x 20 cm) por meio de conjunto DESAGA, na espessura de 0,25 mm. Como fase móvel utilizaram-se os seguintes sistemas eluentes, em proporções volumétricas:

- SISTEMA A: acetato de etila : etanol : ácido acético glacial ( 65 : 20 : 15 )
- SISTEMA B: n-butanol : água : ácido acético glacial ( 3 : 1 : 1 )
- SISTEMA C: clorofórmio : metanol : ácido acético glacial ( 90 : 10 : 1 )

Sobre a cromatoplaça foram aplicados 10 $\mu$ l de uma solução metanólica da amostra (10 mg/mL) e o mesmo volume de soluções metanólicas da substância referência e de ácido maleico, na mesma concentração. Procedeu-se o desenvolvimento ascendente dos cromatogramas, em câmara saturada, até altura de aproximadamente 16 cm. Após a secagem do suporte à temperatura ambiente, sob ventilação, as substâncias foram visualizadas por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta, utilizando-se *Lâmpada Universal de Quartzo Fluotest, com comprimentos de onda 254 nm e 360 nm*. Procedeu-se também a revelação química, através da aspersão de reativo de Dragendorff sobre as cromatoplaças e aquecimento em estufa de calor seco, a 100 °C, durante 15 minutos e visualização sob luz visível.

#### **2.2.1.8.3. Espectroscopia na região do infravermelho**

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido através de pastilha de KBr, utilizando-se o aparelho descrito no item 2.1.4..

#### **2.2.1.8.4. Determinação do ponto de fusão**

Determinou-se o ponto de fusão da substância ativa extraída dos comprimidos, utilizando-se o aparelho descrito no item 2.1.4..

#### **2.2.1.8.5. Determinação do poder rotatório**

Determinou-se o poder rotatório utilizando-se solução metanólica (1%) da substância ativa, em polarímetro especificado no item 2.1.4..

### **2.2.2. Estabelecimento de método alternativo para quantificação do maleato de enalapril**

#### **2.2.2.1. Método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol**

Visando a quantificação do maleato de enalapril na forma farmacêutica em estudo, procedeu-se a adaptação do método proposto por KATO (1985).

##### **2.2.2.1.1. Preparo da solução de azul de bromotimol 0,05%**

Em balança analítica, pesaram-se exatamente 50,0 mg de azul de bromotimol, transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade com o auxílio de 20 mL de diclorometano e completando-se o volume com o mesmo solvente. A solução foi preparada 30 minutos antes da realização do experimento.

#### **2.2.2.1.2. Preparo da solução padrão**

Pesaram-se exatamente 50,0 mg de maleato de enalapril padrão, em balança analítica, transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de tampão acetato de sódio/HCl pH 3,2, completando-se o volume com o mesmo tampão. Obteve-se uma solução padrão de concentração final 500 µg/mL, a qual foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.1.3. Curva padrão**

A partir da solução padrão (500 µg/mL), prepararam-se diluições nas concentrações finais 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL, empregando-se tampão acetato de sódio/HCl pH 3,2 como diluente. Aliquotas de 10,0 mL foram utilizadas para cada uma das concentrações, transferiu-se para ampola de separação, procedeu-se a extração com o auxílio de 10,0 mL de solução de azul de bromotimol em diclorometano (0,05%) e coletou-se a fase orgânica. As determinações das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro descrito no item 2.1.4., no comprimento de onda 405 nm, utilizando-se a solução de azul de bromotimol em diclorometano como branco.

#### **2.2.2.1.4. Análise estatística**

A equação da reta, para a representação gráfica da curva padrão, foi determinada através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

Para a obtenção da curva padrão foram utilizados seis pontos, cada qual representando a média aritmética de nove determinações, sendo que os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA).

#### **2.2.2.2. Método espectrofotométrico pelo sulfato de cobre**

Considerando-se que compostos poliaminados e aminoácidos são capazes de formar complexos com metais de transição, particularmente com o cobre (EVANGELISTA, 1981), optou-se por aplicar a metodologia apresentada por CAMPOS (1980) e modificada por VAUCHER (1987), visando-se a quantificação do maleato de enalapril na forma farmacêutica em estudo.

##### **2.2.2.2.1. Preparo da solução de sulfato de cobre 5%**

Em balança analítica, pesaram-se 5,0 g de sulfato cúprico pentaidratado, transferindo-se para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade e completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico 0,01 M.



#### **2.2.2.2.2. Preparo da solução padrão**

Pesou-se, em balança analítica, exatamente 100,0 mg de maleato de enalapril padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 30 mL de água ; completando-se o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se uma solução de concentração final 2,0 mg/mL. A solução foi preparada 30 minutos antes da execução do experimento, permanecendo à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.2.3. Preparo da curva padrão**

A partir da solução padrão (2,0 mg/mL), foram preparadas diluições nas concentrações finais 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/mL, utilizando-se água como solvente.

#### **2.2.2.2.4. Execução do ensaio**

Para o ensaio, empregaram-se alíquotas de 10,0 mL para cada uma das diluições preparadas a partir da solução padrão.

Em copo de Becker, para cada 10,0 mL das diferentes concentrações da solução padrão, adicionou-se 1,0 mL de solução de sulfato de cobre 5% e 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 2 M. Agitou-se, deixando-se em repouso por 5 minutos. Por meio de centrifugação a 4.000 rpm durante 5 minutos, utilizando-se o aparelho especificado no item 2.1.4., separou-se o precipitado de hidróxido cúprico

formado. Os sobrenadantes foram filtrados através de papel Whatman 40 e utilizados para a obtenção da respectiva curva de absorção. As determinações das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro descrito no item 2.1.4., através de varredura entre os comprimentos de onda 400 e 700 nm, empregando-se como branco água ensaiada nas mesmas condições.

#### **2.2.2.3. Método espectrofotométrico pelo cloreto de ferro III**

Sendo o enalapril o éster etílico do enalaprilato, seu metabólito ativo, optou-se por verificar a possibilidade do emprego de reação para a identificação de ésteres, visando a quantificação da substância ativa presente na forma farmacêutica em estudo. Como os ésteres reagem com a hidroxilamina para formar um álcool e um ácido hidroxâmico  $RCONHOH$  e este, em solução ácida, reage com cloreto férrico para formar sais complexos coloridos, geralmente de cor violácea (VOGEL, 1979; KOROLKOVAS, 1984; ALLINGER, 1985), avaliou-se o emprego do ensaio do ácido hidroxâmico como possível método quantitativo.

##### **2.2.2.3.1. Preparo da solução de cloreto férrico 5%**

Pesaram-se, exatamente, 5,0 g de cloreto férrico anidro, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de etanol, completando-se o volume com o mesmo solvente. A solução foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.3.2. Preparo da solução de hidroxilamina 0,5 M**

Em balança analítica, pesaram-se exatamente 3,5 g de cloridrato de hidroxilamina, dissolveu-se em 5 mL de água quente, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade e completou-se o volume com etanol. A solução foi preparada 30 minutos antes da execução do ensaio.

#### **2.2.2.3.3. Preparo da solução padrão**

Pesaram-se, exatamente, 50,0 mg de maleato de enalapril padrão, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de etanol, agitou-se e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução de concentração final 500 µg/mL.

#### **2.2.2.3.4. Preparo da curva padrão**

A partir da solução padrão descrita no item 2.2.2.3.3., prepararam-se diluições nas concentrações finais 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 µg/mL, utilizando-se etanol como diluente.

#### **2.2.2.3.5. Execução do ensaio preliminar**

Em tubo de ensaio contendo cerca de 1 mL da solução padrão descrita no item 2.2.2.3.3., adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico M, agitou-se e

observou-se a coloração produzida pela adição de duas gotas de solução de cloreto férrico 5%.

#### **2.2.2.3.6. Execução do ensaio**

Para cada alíquota de 10,0 mL das diferentes diluições da solução padrão, em frasco de Erlenmeyer, adicionaram-se 2,0 mL de solução de hidroxilamina 0,5 M, 0,4 mL de hidróxido de sódio 6 M e aqueceu-se até ebulição. Após o resfriamento, adicionaram-se 4,0 mL de ácido clorídrico M e 1,0 mL de solução etanólica de cloreto férrico 5%, sob agitação. As determinações das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro especificado no item 2.1.4., utilizando-se varredura entre os comprimentos de onda 380 e 780 nm, visando a obtenção das respectivas curvas de absorção. Como branco, utilizou-se etanol ensaiado nas mesmas condições.

#### **2.2.2.4. Método fluorimétrico pelo 4-cloro-7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol (cloreto de NBD)**

Empregou-se o método descrito por KABASAKALIAN et al. (1977) e modificado por CAMPOS (1980).

#### **2.2.2.4.1. Placas cromatográficas**

Utilizaram-se placas de vidro (20 cm x 20 cm), recobertas por uma camada de 0,25 mm de gel de sílica G60.

#### **2.2.2.4.2. Preparo do reagente para revelação**

Preparou-se uma solução de cloreto de NDB em metanol, na concentração final 0,25 mg/mL. A solução foi mantida em geladeira e ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.4.3. Preparo da solução padrão**

Preparou-se uma solução padrão contendo exatamente 400 µg/mL de maleato de enalapril, utilizando-se metanol como diluente. A solução foi preparada 30 minutos antes do uso, sendo mantida ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.4.4. Preparo da curva padrão**

A partir da solução padrão, prepararam-se diluições nas concentrações finais 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100 µg/mL, utilizando-se metanol como diluente.

#### **2.2.2.4.5. Execução do ensaio**

##### **2.2.2.4.5.1. Ensaio em solução**

Em tubos de ensaio, procedeu-se a reação entre o maleato de enalapril e o cloreto de NBD, utilizando-se alíquotas de 5,0 mL de cada uma das concentrações preparadas para a curva padrão e 1,0 mL de solução do revelador. Como branco, utilizaram-se 5,0 mL de metanol, ensaiado nas mesmas condições do padrão. A percentagem de fluorescência, transmitida pelas soluções, foi determinada em fluorômetro TURNER, modelo 111, empregando-se filtros nos comprimentos de onda 365 e 490 nm como filtros primário e secundário, respectivamente. O padrão de maior concentração foi ajustado para 80% de transmissão de fluorescência, seguindo-se a leitura das demais soluções do padrão e do branco. Das leituras obtidas, foi subtraído o valor encontrado para o teste branco.

##### **2.2.2.4.5.2. Ensaio em placa**

Sobre a cromatoplaça, previamente ativada em estufa de calor seco a 120 °C por 10 minutos, foram aplicados 2,5 µl de cada uma das diluições preparadas a partir da solução padrão, utilizando-se seringa DESAGA. Procedeu-se ao desenvolvimento cromatográfico ascendente, em câmara saturada, empregando-se sistema eluente composto de clorofórmio : metanol : ácido acético glacial (90:10:1), em proporções volumétricas. Após o desenvolvimento, a cromatoplaça foi seca em estufa a 120 °C, durante 10 minutos. Nebulizou-se a cromatoplaça com o revelador e procedeu-se a nova secagem em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o resfriamento, as manchas, de coloração amarelada sob luz visível e fluorescência verde

sob luz ultravioleta (360 nm), foram raspadas para tubos de ensaio secos, agitadas com 5,0 mL de etanol absoluto e duas gotas de ácido clorídrico fumegante, sendo que as suspensões foram submetidas à centrifugação por 3 minutos, a 3.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para balões volumétricos de 25,0 mL de capacidade e os resíduos lavados com mais 5,0 mL de etanol absoluto e uma gota de ácido clorídrico. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram colocados nos respectivos balões volumétricos, completando-se os volumes com etanol. Como branco, utilizou-se o sobrenadante obtido pela raspagem da sílica de fundo, eluída e trabalhada nas mesmas condições do padrão. A percentagem de fluorescência transmitida pelas soluções, foi determinada conforme descrito no item 2.2.2.4.5.1. .

#### **2.2.2.5. Método fluorimétrico pelo o-ftaldialdeído**

Visando a quantificação do maleato de enalapril na forma farmacêutica em estudo, verificou-se a possibilidade de adaptação do método descrito por TOCCO et al. (1982), empregando-se o-ftaldialdeído como reagente fluorogênico.

##### **2.2.2.5.1. Preparo do reagente fluorogênico**

Em balança analítica, pesaram-se exatamente 0,25 g de o-ftaldialdeído, transferiu-se para balão volumétrico de 25,0 mL de capacidade, com o auxílio de 10 mL de metanol, completando-se o volume com o mesmo solvente.

Transferiram-se 10,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50,0 mL de capacidade e completou-se o volume com solução de hidróxido de sódio 0,3 M, obtendo-se uma solução de concentração final 2,0 mg/mL. A solução foi preparada 15 minutos antes do uso, permanecendo em geladeira e ao abrigo da luz.

#### **2.2.2.5.2. Preparo da solução padrão**

Em balança analítica, pesaram-se exatamente 40,0 mg de maleato de enalapril padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de metanol, completando-se o volume com o mesmo solvente. Obteve-se uma solução de concentração final 400,0 µg/mL. A solução foi preparada 30 minutos antes do uso.

#### **2.2.2.5.3. Preparo da curva padrão**

A partir da solução padrão, preparada conforme descrito no item 2.2.2.5.2., prepararam-se diluições nas concentrações finais 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL, utilizando-se metanol como diluente.

#### **2.2.2.5.4. Execução do ensaio**

Para tubos de ensaio secos, transferiram-se 5,0 mL de cada uma das diluições do padrão, adicionaram-se 2,5 mL de solução de o-ftaldialdeído/NaOH e deixou-se em repouso, à temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C), durante 20 minutos. Após



este período, adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico 6 *M* e agitou-se manualmente durante 30 segundos. Como branco, utilizou-se 5,0 mL de metanol, ensaiado nas mesmas condições do padrão. A percentagem de fluorescência transmitida pelas soluções foi determinada em fluorômetro TURNER, modelo 111, empregando-se filtros nos comprimentos de onda 365 e 490 nm, como filtros primário e secundário, respectivamente. O branco foi utilizado para zerar o aparelho. O ensaio foi realizado 15 minutos após a execução da reação com o reagente fluorogênico.

#### **2.2.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Para o desenvolvimento do método descrito no presente estudo, utilizou-se o aparelho de cromatografia líquida especificado no item 2.1.4. , observando-se as condições descritas na Tabela 2.

##### **2.2.2.6.1. Preparo da solução padrão**

Pesaram-se exatamente 40,0 mg de maleato de enalapril padrão, em balança analítica, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 *M*, submeteu-se à agitação mecânica durante 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução de concentração final 400 µg/mL.

**Tabela 2:** Condições observadas no desenvolvimento do método por CLAE

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Coluna	Spherisorb ODS I (25,0 cm x 4,6 mm i.d.)
Fase móvel	acetonitrila/tampão fosfato de potássio 0,05 M (40 : 60 v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Pressão no sistema	± 36 bar
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS
Comprimento de onda para leitura	214 nm
Filtro de saída	1,2
Velocidade de registro	0,5 cm/min
Atenuação	512
Volume injetado	20 µl

#### **2.2.2.6.2. Preparo da curva padrão**

Prepararam-se diluições a partir da solução padrão, descrita no item 2.2.2.6.1., nas concentrações finais 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 e 120,0  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,05 *M* como diluente.

#### **2.2.2.6.3. Preparo das amostras**

Em gral de porcelana, trituraram-se 10 comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril (teor declarado). Pesou-se, em balança analítica, o equivalente a um peso médio, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, com o auxílio de 20 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 *M* (pH 5,0), submeteu-se à agitação mecânica durante 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Filtrou-se através de papel Whatman 40 e prepararam-se diluições na concentração final 80  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,05 *M* como diluente.

#### **2.2.2.6.4. Execução do ensaio**

Os constituintes da fase móvel foram misturados previamente, filtrados através de filtro de membrana MILLIPORE, modelo FHLP 01300 e desaerados por agitação, a pressão reduzida, durante 30 minutos. Após este período, transferiu-se a fase móvel para o frasco reservatório de uma das bombas de fluxo e procedeu-se a estabilização da coluna, nas condições do ensaio, durante 60 minutos. Com o sistema estabilizado, injetaram-se as diluições preparadas para a obtenção da

curva padrão, no volume de 20 µl, previamente filtradas através de filtro de membrana MILLIPORE, modelo FHLP 04700.

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente de 23 °C ± 2 °C.

#### 2.2.2.6.5. Cálculos

As áreas absolutas dos picos correspondentes a cada diluição de padrão foram plotadas em gráfico de área *versus* concentração.

A equação da reta, para a representação gráfica da curva padrão, foi determinada através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

As determinações dos valores referentes a fator de resolução, fator de simetria e número de pratos teóricos, para enalapril (base), foram obtidos segundo descrito por LECOMPTE (1986) e USP XXII (1990).

A concentração da amostra foi determinada pela interceptação da reta, na curva obtida pela regressão linear dos pontos encontrados para as diluições do padrão. O percentual do valor rotulado foi obtido pela seguinte equação:

$$C = \frac{ct}{ce} \times 100$$

Onde:

C = percentual em relação ao valor rotulado

ct = concentração da amostra, obtida através da curva padrão, em  $\mu\text{g/mL}$

ce = concentração esperada da amostra, em  $\mu\text{g/mL}$

Para a padronização do método, utilizou-se a média de 6 determinações, realizadas em triplicata.

#### **2.2.2.6.6. Teste de recuperação**

Com o objetivo de verificar a exatidão do método, foram executados testes de recuperação, adicionando-se quantidades conhecidas de solução padrão à uma solução de amostra, preparada conforme descrito no item 2.2.2.6.3. .

#### **2.2.2.6.7. Obtenção dos principais produtos de degradação**

##### **2.2.2.6.7.1. Obtenção do enalaprilato**

Trituraram-se 10 comprimidos em gral de porcelana, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL de capacidade, juntamente com 25 mL de metanol, seguindo-se a extração da substância ativa sob agitação mecânica,

durante 30 minutos. Após a extração, filtrou-se através de papel Whatman 40, descartando-se os primeiros 5 mL do filtrado. A fração metanólica foi submetida à hidrólise alcalina, utilizando-se NaOH 6 M, na proporção de 5 moles da base para 1 mol da substância ativa, em presença de água. A solução foi mantida em ebulição, sob refluxo, durante 60 minutos. Foram coletadas alíquotas aos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, contados a partir do início da ebulição. Amostras referentes a cada um dos tempos de coleta foram submetidas à cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas cromatográficas (10 x 20 cm), de procedência Merck, tendo como fase estacionária gel de sílica GF<sub>254</sub>nm. Como fase móvel, utilizou-se o sistema eluente composto por n-butanol : água : ácido acético (3:1:1), em proporções volumétricas. A visualização das substâncias foi efetuada segundo descrito no Item 2.2.1.8.2..

Após a identificação do enalaprilato por CCD, o mesmo foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência, visando a determinação do respectivo tempo de retenção, segundo o método proposto no presente estudo.

#### **2.2.2.6.7.2. Obtenção do derivado dicetopiperazínico**

Em gral de porcelana, trituraram-se 10 comprimidos e procedeu-se a extração, como descrito no Item 2.2.1.8.1.. A fração metanólica foi mantida em ebulição, sob refluxo, durante 60 minutos e, em seguida, evaporada à secura em evaporador rotatório e sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspenso em 10 mL de acetona, obtendo-se cristais brancos após evaporação sob corrente de ar quente. Os cristais foram submetidos à secagem em estufa, a 30 °C, sob vácuo, durante 12 horas. A substância seca foi analisada por cromatografia em camada delgada,

conforme descrito no item 2.2.1.8.2., bem como por cromatografia líquida de alta eficiência, objetivando-se a determinação do respectivo tempo de retenção, utilizando-se as condições propostas no presente estudo.

### **2.2.3. Estudo da estabilidade**

Realizou-se o presente estudo com a finalidade de avaliar a degradação de comprimidos de maleato de enalapril, em seu acondicionamento original, sob diferentes condições, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência proposto pelo autor.

#### **2.2.3.1. Estabilidade térmica**

As amostras foram submetidas às temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C, em estufa de calor seco, munidas de termômetro e termostato, apresentando uma variação de  $\pm 2$  °C.

Utilizaram-se 80 comprimidos para cada temperatura, efetuando-se a coleta de 10 amostras nos tempos de 2, 5, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, as quais foram submetidas à análise quantitativa pelo método descrito no item 2.2.2.6., bem como à observação macroscópica.

**2.2.3.2. Estabilidade frente à umidade**

As amostras foram submetidas às umidades relativas de 30%, 60% e 90%.

Utilizaram-se 60 comprimidos para cada condição experimental, coletando-se 10 amostras nos tempos de 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias. Procedeu-se à análise quantitativa através do método descrito no Item 2.2.2.6., bem como à observação macroscópica.

Os diferentes níveis de umidade relativa foram obtidos segundo os procedimentos detalhados por GAUDY (1984).

Utilizaram-se 3 dessecadores com capacidade de 10 L, contendo 2 kg de soluções aquosas de ácido sulfúrico. As composições das soluções e as respectivas umidades relativas estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Composições das soluções de ácido sulfúrico

DESSECADOR	ÁCIDO SULFÚRICO	ÁGUA	UMIDADE RELATIVA
1	358,2 g	1.641,8 g	90 %
2	767,0 g	1.233,0 g	60 %
3	1.049,0 g	951,0 g	30 %



Sobre a grade de porcelana de cada um dos dessecadores, foi colocado um higrômetro, previamente aferido. Com o auxílio de silicone, os dessecadores foram vedados e permaneceram em ambiente climatizado, durante 8 dias, à temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ao abrigo da luz, sendo abertos a cada 24 horas, por 30 segundos. Durante este período de padronização, as flutuações registradas nas umidades relativas foram as seguintes:

**Dessecador 1:** umidade relativa =  $90\% \pm 4\%$

**Dessecador 2:** umidade relativa =  $60\% \pm 2\%$

**Dessecador 3:** umidade relativa =  $30\% \pm 2\%$

Como os valores registrados para cada uma das umidades relativas não ultrapassou 10% dos valores teóricos esperados, julgou-se adequado proceder os ensaios nas condições experimentais descritas.

#### **2.2.3.3. Estabilidade fotoquímica**

Embora estando a forma farmacêutica em estudo acondicionada em fita aluminizada, decidiu-se pela realização do estudo de degradação fotoquímica, uma vez que não foram encontrados dados concretos a este respeito na literatura pesquisada.

Devido à impossibilidade de reprodução do modelo proposto por HIBBERT (1991) para a avaliação da degradação fotoquímica, Inicialmente optou-se por realizar o estudo utilizando-se lâmpada de vapor de mercúrio, em câmara fechada. Entretanto, durante o período de padronização das condições experimentais, verificou-se que a temperatura no interior da câmara atingiu níveis considerados elevados ( $\pm 60^{\circ}\text{C}$ ).

Na tentativa de evitar a interferência do fator temperatura, optou-se por realizar a avaliação do comportamento da forma farmacêutica, em sua embalagem original, quando submetida à radiação ultravioleta. Para tanto, utilizou-se Lâmpada Germicida SANKYO DENKI, com espectro de emissão entre 290 e 310 nm. Utilizaram-se 10 comprimidos, os quais foram mantidos sob as condições experimentais descritas durante 15 dias. Ao final deste período, procedeu-se à análise quantitativa através do método descrito no Item 2.2.2.6. (CLAE), bem como à observação macroscópica, configurando estudo do tipo "tudo ou nada". A temperatura no interior da câmara oscilou entre  $25^{\circ}\text{C}$  e  $31^{\circ}\text{C}$ .



3.1. Análise físico-química das amostras

Os resultados das determinações de características organolépticas, dimensões, peso médio, friabilidade, dureza, desintegração e teor de umidade dos comprimidos, estão apresentados na tabela 4.

Nas figuras 10 e 11 estão indicadas, respectivamente, as cartas de controle do peso médio e da dureza dos comprimidos analisados.

**Tabela 4:** Resultados da análise físico-química dos comprimidos de maleato de analapril 20,0 mg.

TESTE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Caracteres organolépticos	Comprimidos de forma elipsóide, coloração amarelada, vincado em uma das faces e a inscrição "714" gravada na face oposta	de acordo com a especificação
Dimensões	————	L <sup>1</sup> = 7,12 mm ± 0,05 mm* E <sup>2</sup> = 3,88 mm ± 0,08 mm* C <sup>3</sup> = 8,07 mm ± 0,05 mm*
Peso médio	199,9 mg	199,7 mg
Friabilidade	perda inferior a 1,5%	0,17%
Dureza	mínimo 3,0 Kgf	13,0 Kgf ± 1,1 Kgf*
Desintegração	6 comprimidos desintegram em água, a 37 °C ± 2 °C, em 30 minutos	de acordo com a especificação
Umidade	————	3,5%

( \* ) média ± erro padrão da média; ( 1 ) largura; ( 2 ) espessura; ( 3 ) comprimento

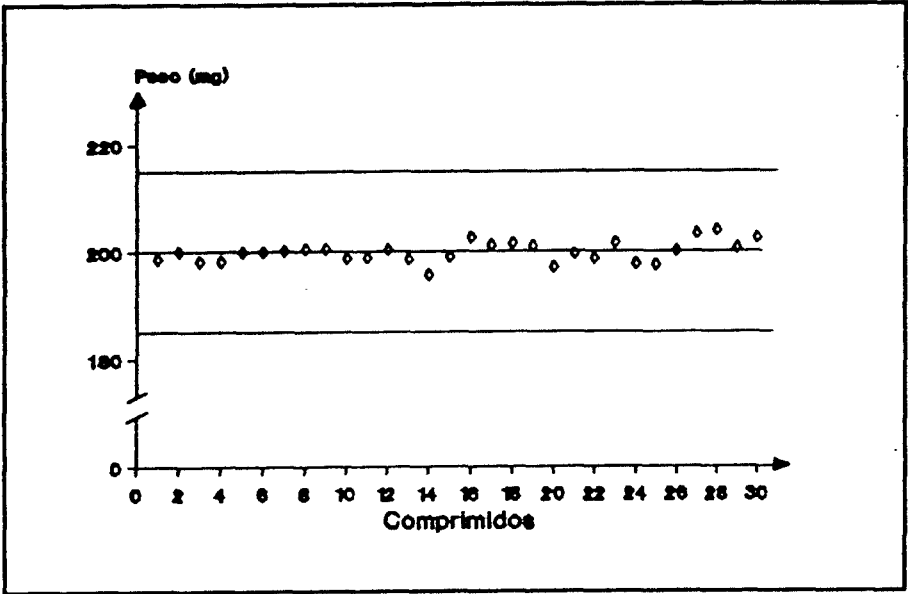


Figura 10: Variação de peso dos comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril. As linhas representam os limites de variação permitidos, segundo a F. Bras. IV.

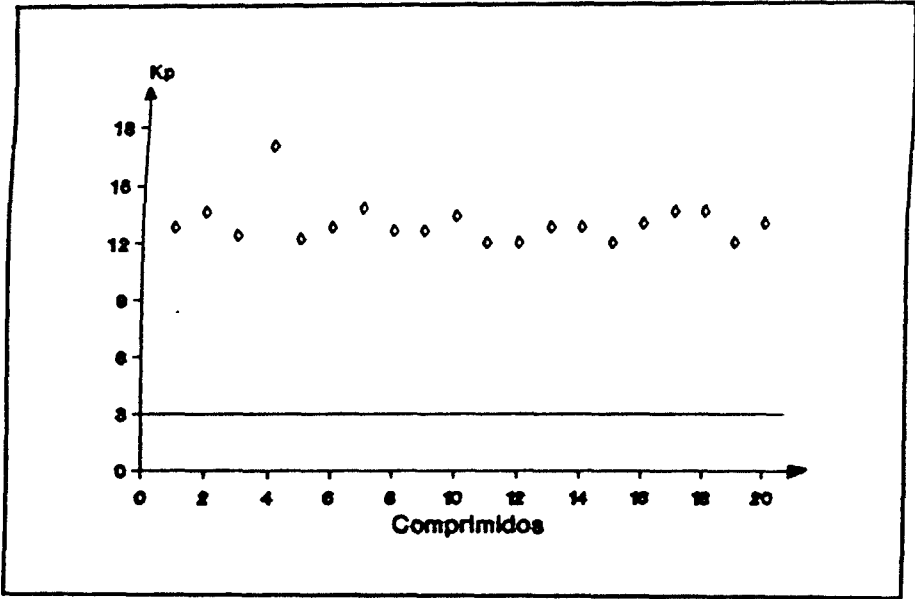


Figura 11: Variação de dureza dos comprimidos de 20 mg de maleato de enalapril. A linha representa a dureza mínima requerida para comprimidos, segundo a F. Bras. IV.

### 3.2. Identificação do maleato de enalapril

#### 3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Utilizando-se os sistemas eluentes denominados "A", "B" e "C", descritos no Item 2.2.1.8.2., foi possível visualizar as manchas correspondentes a enalapril (base) e ácido maleico, cujos valores de Rf estão apresentados na tabela 5. As figuras 12, 13 e 14 apresentam os cromatogramas obtidos nos sistemas indicados.

**Tabela 5:** Valores de Rf para o maleato de enalapril

SISTEMA ELUENTE	ENALAPRIL ( BASE)	ÁCIDO MALEICO
A	0,33	( * )
B	0,70	0,59
C	0,60	0,25

( \* ) A substância permaneceu retida no ponto de aplicação

Os resultados obtidos na análise por cromatografia em camada delgada, indicaram que a substância extraída dos comprimidos apresentou comportamento semelhante à substância referência, sendo que os valores de Rf foram compatíveis com aqueles relatados na literatura (IP & BRENNER, 1987; OKLOBDIZIJA et al., 1988), para os diferentes sistemas eluentes utilizados.

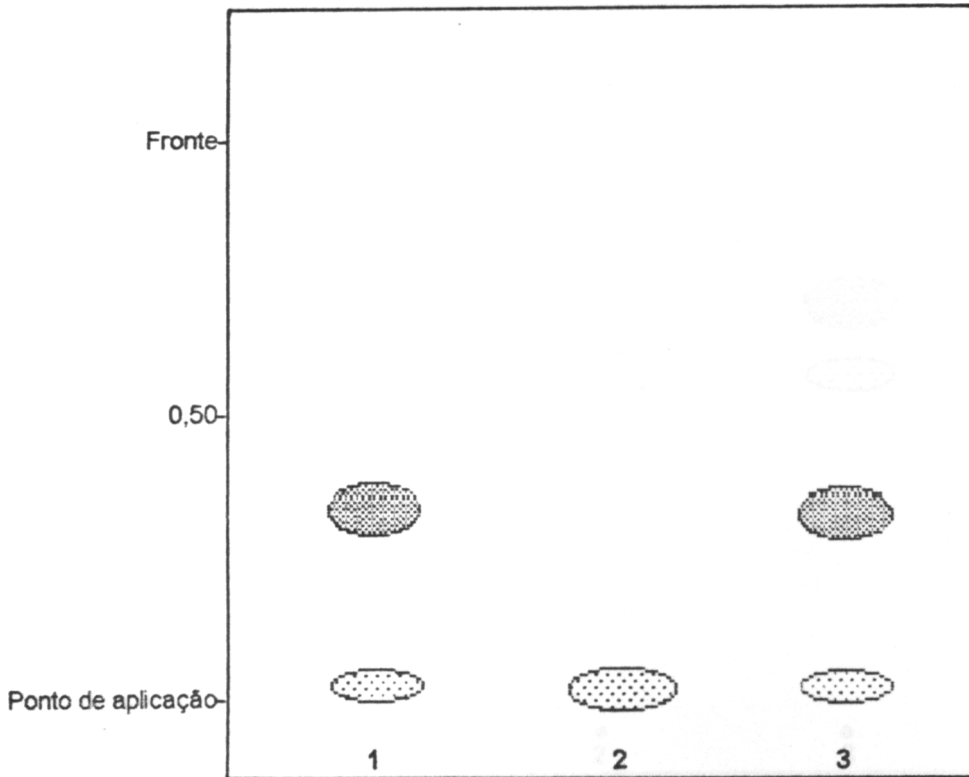


Figura 12: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril. Fase fixa = sílica gel GF 254; fase móvel = acetato de etila:etanol:ác. acético (65:20:15 v/v) (SISTEMA A).

1 = Maleato de enalapril padrão

2 = Ácido maleico padrão

3 = Amostra extraída dos comprimidos

■ Enalapril (base), visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm) e por revelação química com reativo de Dragendorff.

□ Ácido maleico, visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm).

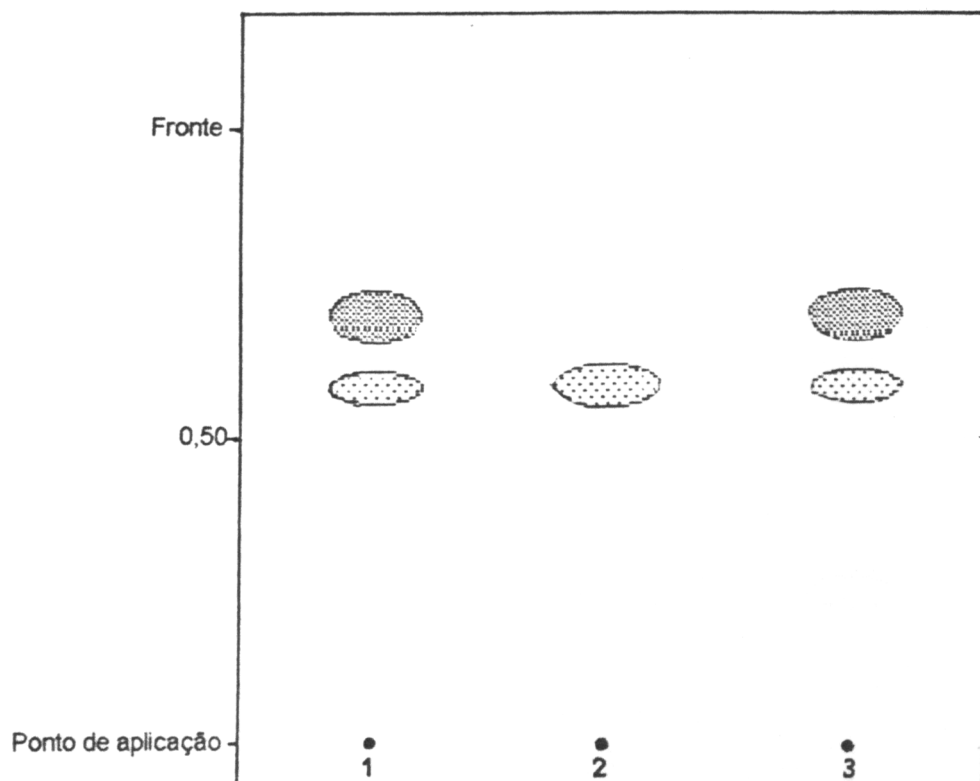


Figura 13: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril. Fase fixa = sílica gel GF 254; fase móvel = n-butanol:água:ác. acético (3:1:1 v/v) (SISTEMA B).

1 = Maleato de enalapril padrão

2 = Ácido maleico padrão

3 = Amostra extraída dos comprimidos

■ Enalapril (base), visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm) e por revelação química com reativo de Dragendorff.

● Ácido maleico, visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm).



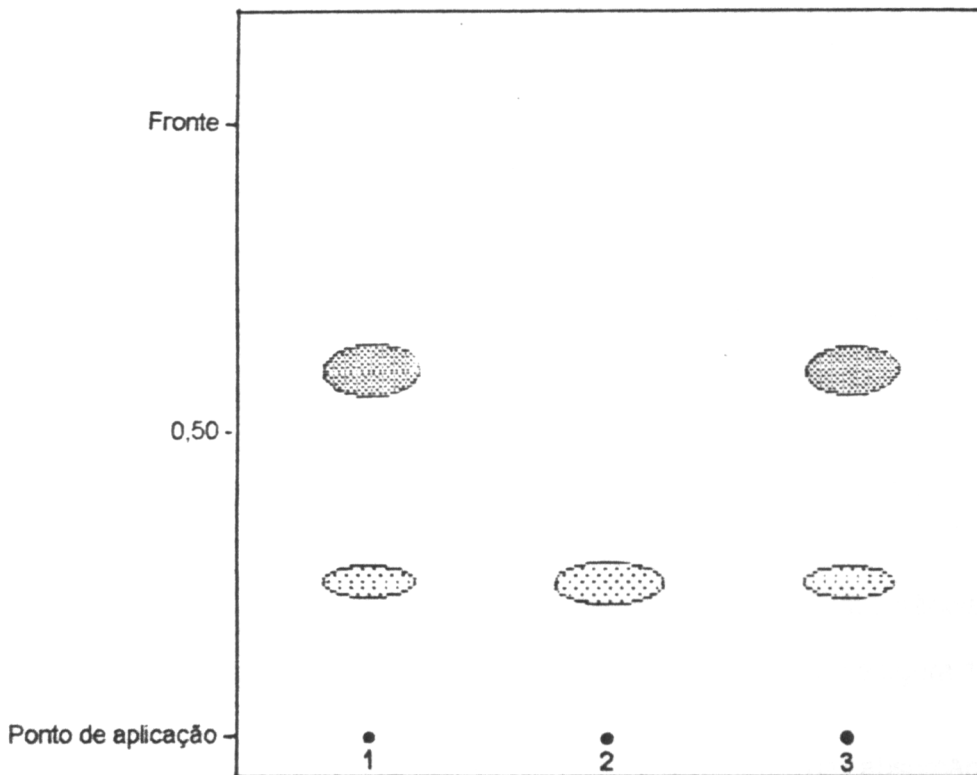


Figura 14: Análise cromatográfica das amostras de maleato de enalapril. Fase fixa = sílica gel GF 254; fase móvel = clorofórmio : metanol : ác. acético (90:10:1 v/v) (SISTEMA C).

1 = Maleato de enalapril padrão

2 = Ácido maleico padrão

3 = Amostra extraída dos comprimidos

■ Enalapril (base), visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm) e por revelação química com reativo de Dragendorff.

□ Ácido maleico, visualizado por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta (254 nm).

Quanto ao método de revelação empregado, foi possível a visualização tanto das manchas de enalapril (base) como de ácido maleico, por extinção de fluorescência sob luz ultravioleta, no comprimento de onda 254 nm. Empregando-se revelação química, através da aspersão de reativo de Dragendorff sobre a cromatoplaca, visualizou-se apenas as manchas de enalapril (base), as quais apresentaram coloração amarela sob luz visível, após aquecimento em estufa de calor seco a 100°C, durante 15 minutos. Este último método de revelação mostrou-se importante, principalmente quando da utilização do sistema eluente denominado "B", uma vez que os valores de R<sub>f</sub> obtidos para ácido maleico e enalapril (base) foram bastante próximos.

### 3.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de infravermelho da substância extraída dos comprimidos, obtido por dispersão em KBr, está apresentado na figura 15.

Analisando-se o referido espectro de absorção, verificou-se a presença das seguintes bandas características: estiramento C-H aromático entre 3200 e 2970  $\text{cm}^{-1}$ ; absorção em 1740  $\text{cm}^{-1}$ , atribuível ao grupamento carbonila de ácido carboxílico  $\beta$ -insaturado (ácido maleico); uma banda de absorção a 1720  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao grupamento carbonila do éster etílico e uma forte absorção em 1640  $\text{cm}^{-1}$ , atribuível à carbonila do grupamento amida terciário. Bandas de menor intensidade foram verificadas para o grupamento amínico secundário protonizado (2800-2200  $\text{cm}^{-1}$ ), para a carbonila do íon carboxilato (1570  $\text{cm}^{-1}$ ) e para as vibrações características de um grupo fenila monosubstituído (700-670  $\text{cm}^{-1}$ ).

As bandas de absorção evidenciadas para a substância ativa em estudo, são compatíveis com os relatos apresentados na literatura (PATCHETT et al., 1980; IP & BRENNER, 1987; OKLOBDIZIJA et al., 1988).

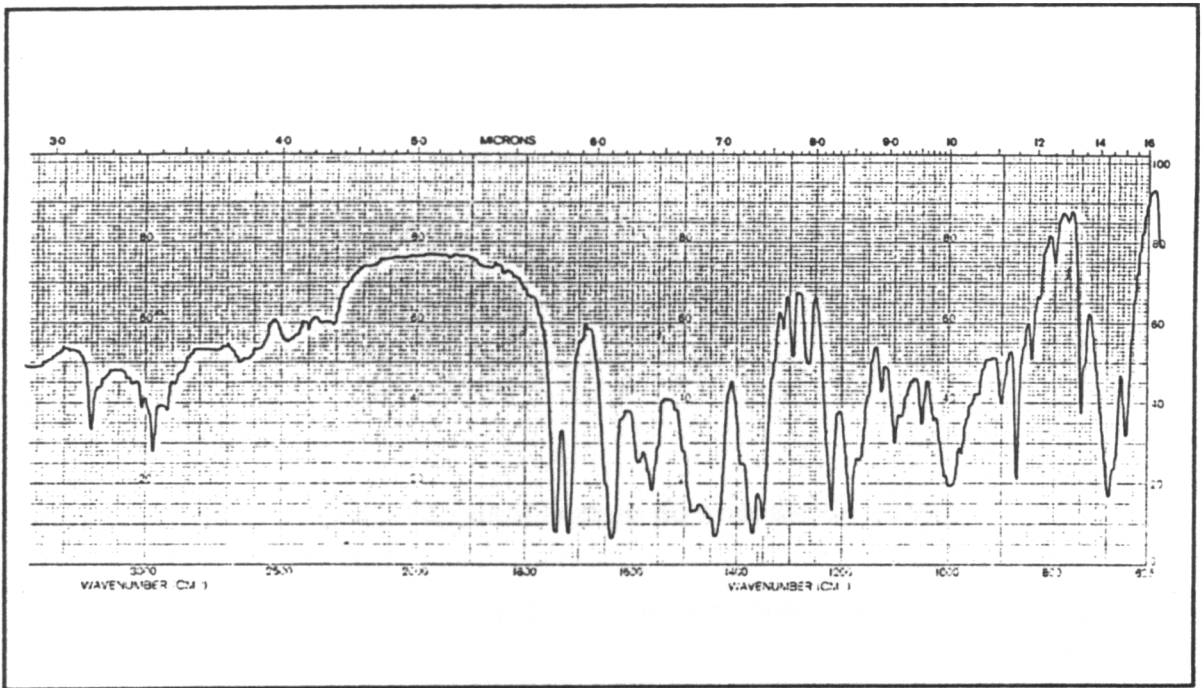


Figura 15: Espectro de infravermelho do maleato de enalapril extraído dos comprimidos, obtido por dispersão em KBr.

### **3.2.3. Determinação do ponto de fusão**

Os cristais secos, obtidos conforme descrito no item 2.2.1.8.1., apresentaram faixa de fusão entre 148°C e 152°C, sendo compatível com aquela indicada na literatura (PATCHETT et al., 1980; IP & BRENNER, 1987; OKLOBDIZIJA et al., 1988; BUDAVARI, 1989).

### **3.2.4. Determinação do poder rotatório**

O poder rotatório, determinado em solução metanólica 1% e temperatura de 25 °C, foi -42,5° , estando de acordo com a faixa preconizada na literatura (PATCHETT et al., 1980; IP & BRENNER, 1987; OKLOBDIZIJA et al., 1988; BUDAVARI, 1989; USP, 1990).

## **3.3. Estudo de métodos para quantificação do maleato de enalapril**

### **3.3.1. Método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol**

As medidas de absorvância obtidas para as diferentes concentrações de solução padrão de maleato de enalapril, utilizando-se o método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol, estão apresentadas na tabela 6.

A representação gráfica da regressão linear e a equação da reta para a referida curva padrão estão indicadas na figura 16.

A tabela 7 apresenta os elementos necessários à análise de variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão.

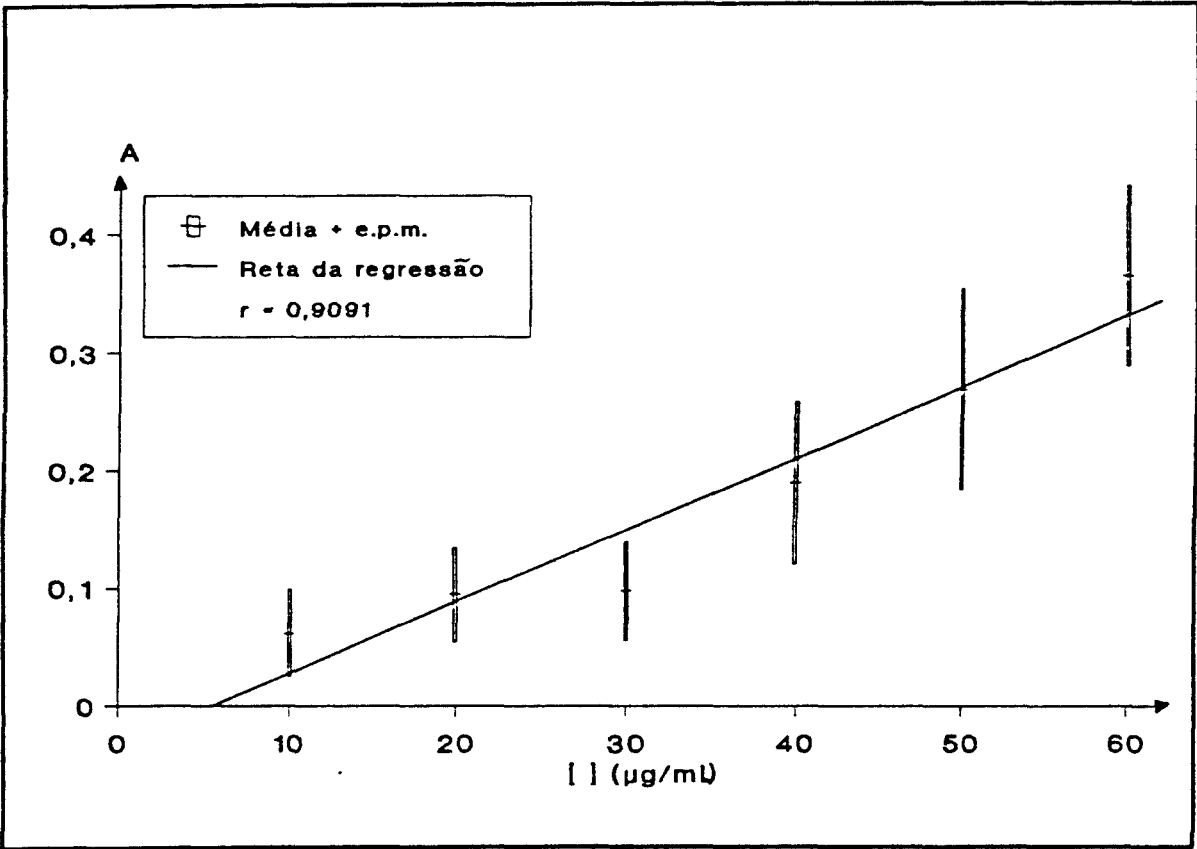
Tabela 6: Absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão, através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ABSORVÂNCIAS			ABSORVÂNCIAS MÉDIAS ± e.p.m.	CV %	PONTOS CALCULADOS
10,0	0,059	0,050	0,071	0,062 ± 0,037	19,5	0,028
	0,056	0,046	0,081			
	0,074	0,068	0,052			
20,0	0,081	0,092	0,112	0,095 ± 0,040	15,2	0,089
	0,074	0,116	0,090			
	0,100	0,084	0,106			
30,0	0,094	0,119	0,087	0,098 ± 0,042	15,9	0,149
	0,085	0,103	0,098			
	0,079	0,125	0,090			
40,0	0,203	0,151	0,096	0,190 ± 0,069	22,7	0,210
	0,225	0,237	0,184			
	0,203	0,197	0,216			
50,0	0,397	0,263	0,250	0,269 ± 0,085	23,9	0,271
	0,181	0,198	0,290			
	0,318	0,282	0,245			
60,0	0,402	0,390	0,287	0,365 ± 0,076	14,2	0,332
	0,274	0,349	0,400			
	0,397	0,415	0,370			

**Tabela 7:** Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de maleato de enalapril, através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol.

<b>FONTES DE VARIÇÃO</b>	<b>GL</b>	<b>SOMA DOS QUADRADOS</b>	<b>VARIÂNCIA</b>	<b>F</b>
<b>ENTRE</b>	<b>5</b>	<b>0,6319</b>	<b>0,1264</b>	<b>84,27*</b>
Regressão linear	1	0,5837	0,5837	389,13*
Desvio da linearidade	4	0,0482	0,0121	8,07*
<b>RESÍDUO</b>	<b>48</b>	<b>0,0742</b>	<b>0,0015</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>0,7061</b>		

(\*) Significativo para  $p < 0,05$



**Figura 16:** Representação gráfica da curva padrão de maleato de enalapril, obtida através do método espectrofotométrico por pareamento iônico com azul de bromotimol..

### **3.3.2. Método espectrofotométrico pelo sulfato de cobre**

Os ensaios foram realizados utilizando-se as diluições preparadas para a obtenção da curva padrão, descritas no Item 2.2.2.2.3..

Objetivando-se a determinação do comprimento de onda de absorção máxima do possível complexo formado entre maleato de enalapril e sulfato de cobre, realizou-se varredura entre os comprimentos de onda 400 nm e 700 nm. Entretanto, não foi observada a existência de pico de absorção máxima na faixa compreendida entre os comprimentos de onda empregados.

### **3.3.3. Método espectrofotométrico pelo cloreto de ferro III**

Procedeu-se, inicialmente, a execução do ensaio preliminar indicado por VOGEL (1979), segundo descrito no Item 2.2.2.3.5., como forma de avaliar a possibilidade de utilização do ensaio do ácido hidroxâmico no presente estudo. Uma vez que o resultado deste ensaio preliminar não indicou a presença de substância capaz de reagir diretamente com o cloreto férrico, o que resultaria no mascaramento da reação entre enalapril e hidroxilamina e posterior reação do respectivo ácido hidroxâmico formado com cloreto férrico, resultando na formação de um sal complexo colorido, executou-se o ensaio conforme descrito no Item 2.2.2.3.6. .

Utilizando-se as diluições da solução padrão de maleato de enalapril descritas no Item 2.2.2.3.4., procedeu-se o ensaio e verificou-se a existência de comprimento de onda de absorção máxima para o possível complexo formado,



executando-se varredura entre os comprimentos de onda 380 nm e 780 nm. Observou-se a presença de um pico a 660 nm, de baixa intensidade, o qual também foi observado no registro obtido com o branco correspondente.

#### **3.3.4. Método fluorimétrico pelo 4-cloro-7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol (cloreto de NBD)**

Inicialmente, procedeu-se a escolha dos filtros primário e secundário, capazes de proporcionar maior transmissão de fluorescência, entre aqueles disponíveis. Para tanto, utilizou-se a solução padrão de maior concentração, preparada conforme descrito no item 2.2.2.4.4.. Dentre as várias combinações testadas, optou-se pela escolha do par de filtros indicado por TOCCO e colaboradores (1982), sendo os filtros primário e secundário nos comprimentos de onda 365 nm e 490 nm, respectivamente.

Os resultados obtidos na determinação da percentagem de fluorescência transmitida pelas soluções, não discriminaram as diferentes concentrações de padrão utilizadas, seja em solução metanólica ou após desenvolvimento cromatográfico, empregando-se cromatografia em camada delgada, segundo descrito nos itens 2.2.2.4.5.1. e 2.2.2.4.5.2.. Com base nestes resultados, não foi possível a utilização do método para a quantificação do maleato de analapril, nas condições experimentais empregadas.

### **3.3.5. Método fluorimétrico pelo o-ftaldialdeído**

Procedeu-se a adaptação do método proposto por TOCCO e colaboradores (1982), originalmente descrito para a quantificação de enalapril e enalaprilato em amostras biológicas, utilizando-se o-ftaldialdeído como reagente fluorogênico.

A percentagem de fluorescência transmitida pelas diferentes diluições de solução padrão, preparadas segundo descrito no item 2.2.2.5.3., foi determinada empregando-se filtros nos comprimentos de onda 365 nm e 490 nm, como filtros primário e secundário, respectivamente.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que não foi possível a discriminação das diferentes concentrações de solução padrão submetidas à análise, nas condições experimentais utilizadas.

### **3.3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A tabela 8 apresenta as áreas absolutas correspondentes a enalapril (base), relativas a cada uma das diluições da solução padrão, juntamente com os respectivos tempos de retenção.

O coeficiente de variação percentual médio, obtido para o método, foi de 0,83%, indicando a adequada reprodutibilidade dos resultados observados (tabela 8).

**Tabela 8:** Áreas absolutas e tempos de retenção para enalapril (base), em diferentes concentrações, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, para a determinação da curva padrão.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREAS ABSOLUTAS *	TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)*	MÉDIA DAS ÁREAS ABSOLUTAS OBSERVADAS $\pm$ e.p.m.	ÁREA ABSOLUTA CALCULADA	CV %
20,0	1.603.500 1.559.570 1.605.056	6.00 6.00 5.98	$1.589.375 \pm 12.174$	1.544.907	1,62
40,0	2.997.603 3.022.604 3.001.758 3.044.294	5.90 5.90 5.90 5.90	$3.016.565 \pm 9.301$	3.038.455	0,71
60,0	4.463.487 4.505.697 4.449.857	5.89 5.90 5.84	$4.473.014 \pm 13.724$	4.532.004	0,65
80,0	6.131.880 6.084.268 6.039.199 6.074.867	5.91 5.84 5.89 5.90	$6.082.554 \pm 16.535$	6.025.552	0,63
100,0	7.536.025 7.354.594 7.424.807	5.90 5.88 5.90	$7.438.475 \pm 43.126$	7.519.101	1,23
120,0	9.064.856 9.071.071 9.047.017	5.89 5.89 5.90	$9.060.981 \pm 5.886$	9.012.649	0,14

( \* ) Cada ponto representa a média de, pelo menos, 3 determinações.

Os valores de área absoluta, determinados para a obtenção da curva padrão, foram submetidos à análise de variância, cujos elementos necessários estão apresentados na tabela 9.

A representação gráfica da curva padrão e a equação da reta, determinada através do estudo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, estão indicadas na figura 17.

**Tabela 9:** Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão, através do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F
ENTRE	5	122,6587	24,5317	12.265,85 **
Regressão linear	1	122,6021	122,6021	61.301,05 **
Desvio da linearidade	4	0,0386	0,0097	4,83 NS
RESÍDUO	14	0,0276	0,0020	
TOTAL	19	122,6863		

( \*\* ) Significativo para  $p < 0,01$     (NS) Não significativo para  $p < 0,01$

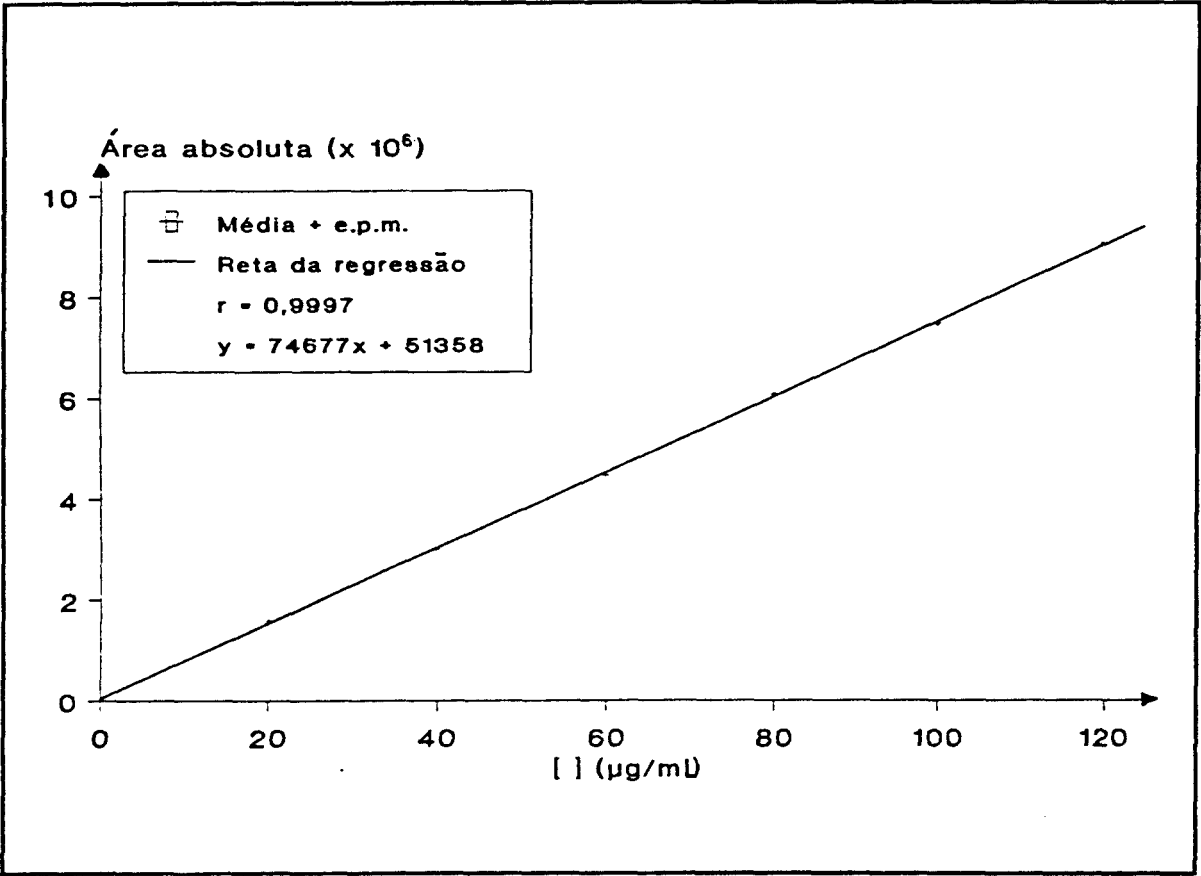


Figura 17: Representação gráfica da curva padrão de maleato de enalapril, obtida por CLAE.

Um cromatograma típico, obtido através do método proposto no presente estudo, com os tempos de retenção correspondentes, está apresentado na figura 18. Nas condições experimentais utilizadas, foram obtidos dois picos, correspondendo, em ordem de eluição, ao ácido maleico e ao enalapril (base), perfazendo um tempo total de análise de aproximadamente nove minutos.

O sistema apresentou eficiência de separação adequada, verificável pela manutenção dos tempos de retenção dos dois picos, não havendo sobreposição significativa dos mesmos, o que não comprometeu a avaliação quantitativa desejada.

O fator de resolução, calculado entre os picos de ácido maleico e enalapril (base), foi 5,34 , confirmando a adequabilidade das condições para o doseamento da substância ativa.

O número de pratos teóricos obtido para enalapril (base) foi 507,0, sendo que o fator de simetria apresentou valor de 0,88.

Os valores de concentração percentual da amostra foram determinados pela interceptação da reta, na curva padrão obtida pela regressão linear, estando apresentados na tabela 10.

Os resultados dos testes de recuperação do método estão apresentados na tabela 11.

As figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas obtidos para os principais produtos de degradação do maleato de enalapril.

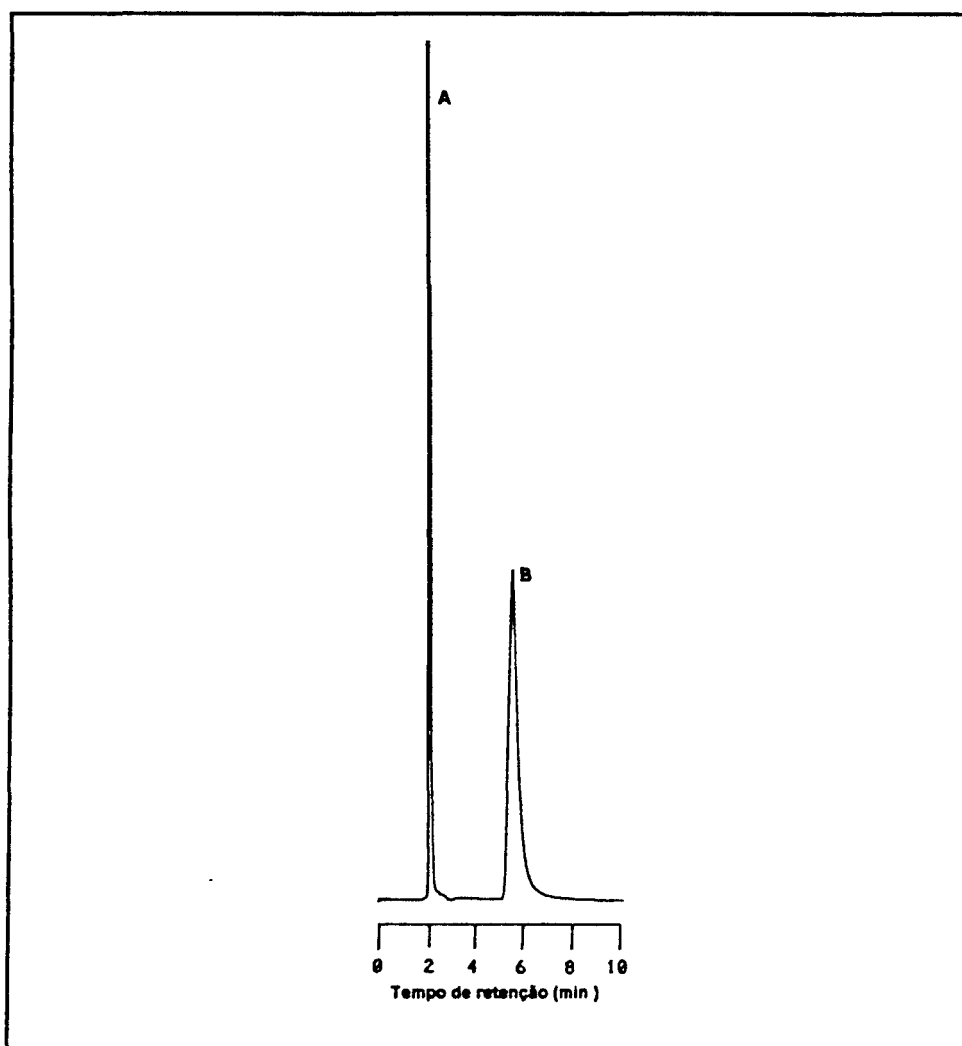


Figura 18: Cromatograma obtido para o maleato de enalapril através de CLAE. (A) ácido maleico (B) enalapril.

Tabela 10: Valores obtidos para o doseamento do maleato de enalapril, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

ENSAIO	RESULTADO (%)	MÉDIA ± e.p.m.	CV %
1	100,05		
2	99,10		
3	99,80		
4	100,12		
5	99,82	99,89 ± 0,10	0,32
6	99,86		
7	100,15		
8	99,84		
9	100,28		
10	99,85		



**Tabela 11:** Dados de recuperação de uma solução padrão de maleato de enalapril adicionada à solução amostra, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

QUANTIDADE ADICIONADA (µg/mL)	QUANTIDADE ENCONTRADA (µg/mL)	RECUPERAÇÃO (TEOR%)
4,00	3,97	99,25
8,00	8,02	100,25
12,00	11,97	99,75
16,00	16,08	100,50

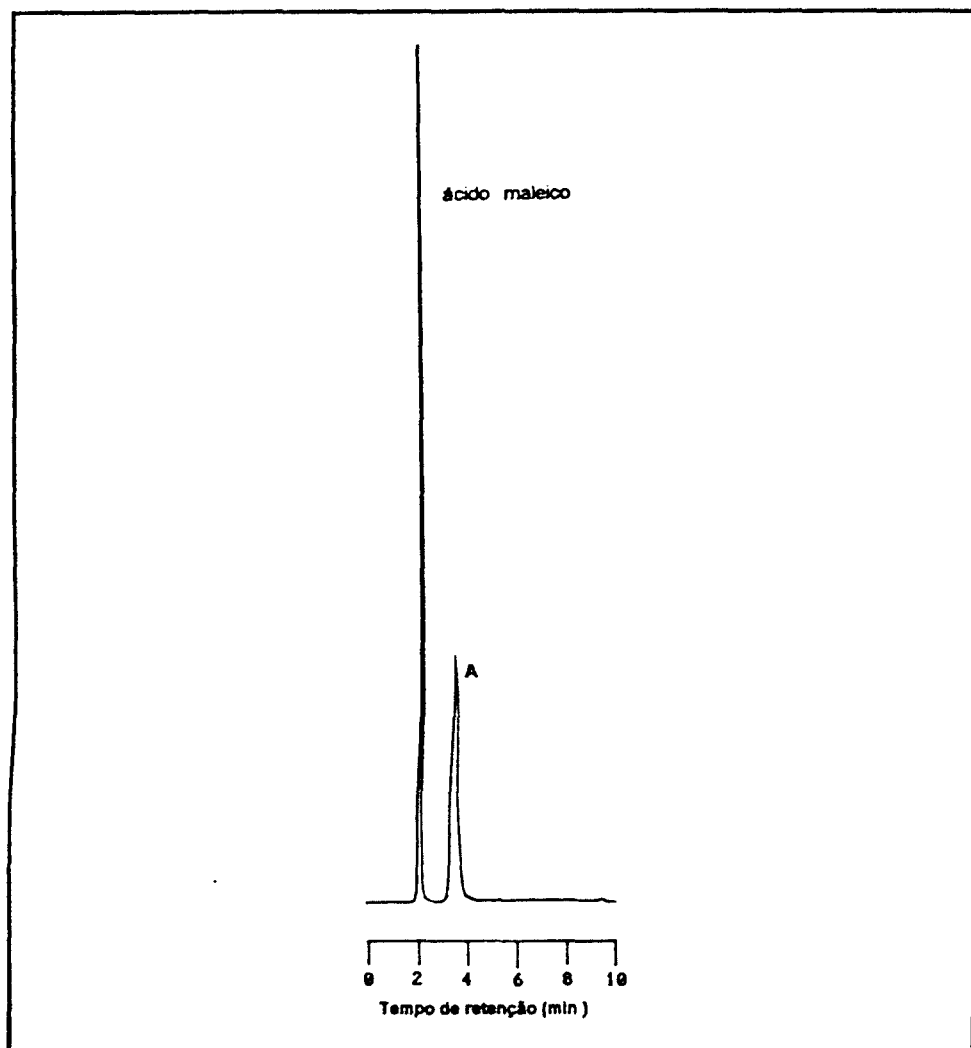


Figura 19: Cromatograma obtido para o produto de hidrólise do enalapril, através de CLAE. (A) enalaprilato.

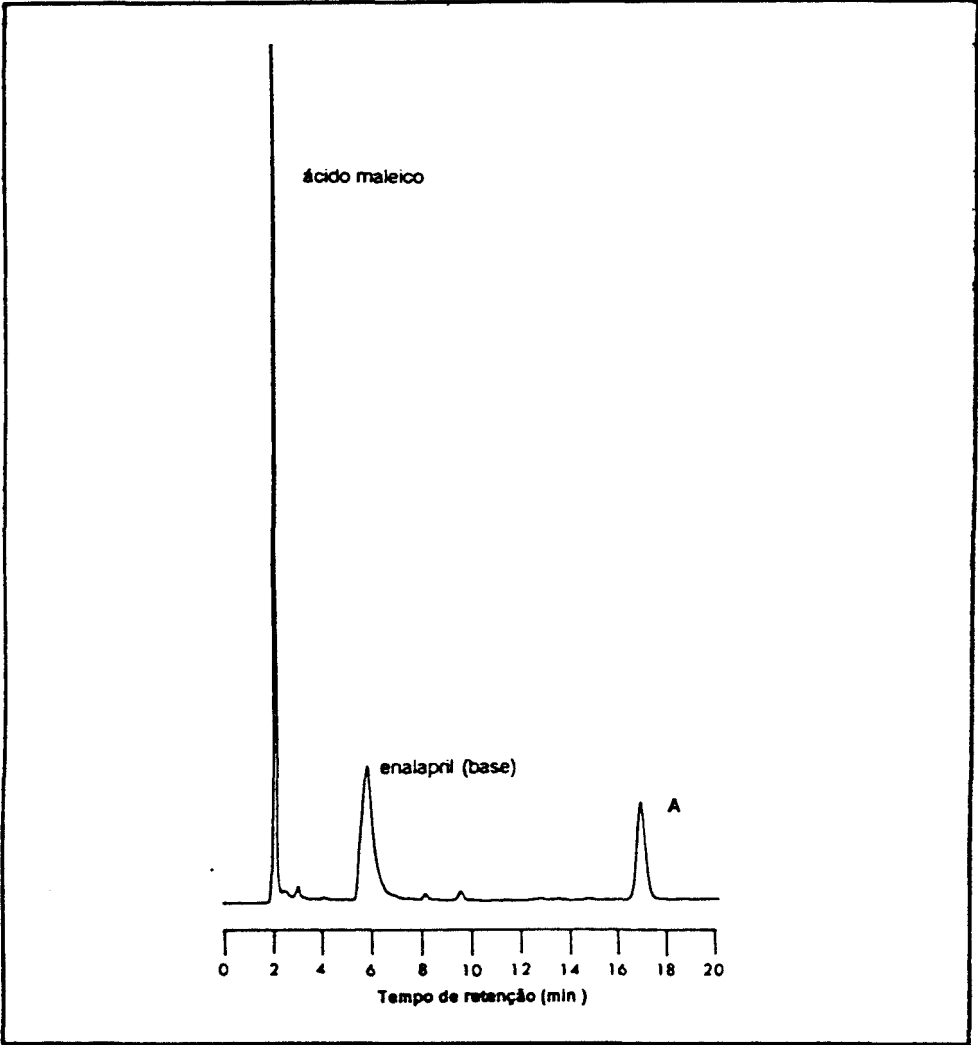


Figura 20: Cromatograma obtido para o produto de ciclização do enalapril, através de CLAE. (A) derivado dicetopiperazínico.

### **3.4. Estudo da estabilidade**

#### **3.4.1. Estabilidade térmica**

Os valores obtidos no acompanhamento da degradação térmica, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência proposto, estão apresentados na tabela 12.

A tabela 13, 14 e 15 contém os valores teóricos, obtidos a partir do cálculo da regressão linear dos dados constantes da tabela 12, para as reações de zero, primeira e segunda ordem, respectivamente.

As amostras submetidas à temperatura de 40°C não apresentaram alterações nas suas características organolépticas, quando da observação macroscópica. Os teores percentuais obtidos nesta temperatura não possibilitaram a determinação correta da velocidade de degradação, bem como da respectiva ordem de reação.

Observou-se alteração significativa da coloração das amostras submetidas à temperatura de 60°C, a partir da segunda semana de exposição, sendo que a coloração originalmente amarelada sofreu escurecimento progressivo durante o período de estudo estabelecido.

As amostras submetidas à temperatura de 80°C apresentaram coloração marrom-escura após a primeira semana de exposição, a qual intensificou-se progressivamente, sendo que aquelas amostras retiradas aos 35, 49 e 63 dias apresentaram-se completamente carbonizadas, o que impediu a determinação quantitativa nestes tempos.

**Tabela 12:** Teores percentuais obtidos no estudo da estabilidade térmica dos comprimidos de maleato de analapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

TEMPERATURA TOMADA DE AMOSTRA <sup>1</sup>	40 °C TEOR % <sup>2</sup>	60 °C TEOR % <sup>2</sup>	80 °C TEOR % <sup>2</sup>
T <sub>0</sub>	99,86	99,86	99,86
T <sub>1</sub>	98,81	96,71	87,76
T <sub>2</sub>	97,12	93,46	75,92
T <sub>3</sub>	95,20	91,00	64,53
T <sub>4</sub>	93,90	88,25	47,35
T <sub>5</sub>	93,00	81,60	31,49
T <sub>6</sub>	92,40	73,40	–
T <sub>7</sub>	91,20	53,20	–
T <sub>8</sub>	89,93	46,90	–

( 1 ) As tomadas de amostra (T) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem a 0, 2, 5, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, respectivamente.

( 2 ) Cada valor representa a média de 6 determinações.

**Tabela 13:** Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 40°C, considerando-se diferentes ordens de reação.

TOMADA DE AMOSTRA <sup>(1)</sup>	REAÇÃO DE ORDEM ZERO <sup>(2)</sup>	REAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM <sup>(3)</sup>	REAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM <sup>(4)</sup>
T <sub>0</sub>	97,60%	97,60%	97,60%
T <sub>1</sub>	97,33%	97,32%	97,31%
T <sub>2</sub>	96,91%	96,89%	96,87%
T <sub>3</sub>	96,64%	96,61%	96,58%
T <sub>4</sub>	95,67%	95,63%	95,58%
T <sub>5</sub>	94,71%	94,66%	94,60%
T <sub>6</sub>	92,78%	92,74%	92,70%
T <sub>7</sub>	90,85%	90,87%	90,88%
T <sub>8</sub>	88,93%	89,03%	89,12%

(1) As tomadas de amostra (T) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem a 0, 2, 5, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, respectivamente

(2) Coeficiente de correlação (r)= -0,9058; equação da reta (y= ax + b):  $y = -0,1377 x + 97,60$

(3) Coeficiente de correlação (r)= -0,9156; equação da reta (log y= ax + b):  $\log y = -0,0006 x + 1,9895$

(4) Coeficiente de correlação (r)= 0,9173; equação da reta (1/y = ax + b):  $1/y = 1,55 \cdot 10^{-5}x + 0,0102$

**Tabela 14:** Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 60°C, considerando-se diferentes ordens de reação.

TOMADA DE AMOSTRA <sup>(1)</sup>	REAÇÃO DE ORDEM ZERO <sup>(2)</sup>	REAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM <sup>(3)</sup>	REAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM <sup>(4)</sup>
T <sub>0</sub>	98,78%	102,22%	105,87%
T <sub>1</sub>	97,12%	99,89%	102,08%
T <sub>2</sub>	94,59%	96,51%	96,88%
T <sub>3</sub>	92,91%	94,32%	93,70%
T <sub>4</sub>	87,03%	87,04%	84,03%
T <sub>5</sub>	81,14%	80,32%	76,18%
T <sub>6</sub>	69,37%	68,39%	64,18%
T <sub>7</sub>	57,60%	58,23%	55,44%
T <sub>8</sub>	45,83%	49,58%	48,80%

(1) As tomadas de amostra (T) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem a 0, 2, 5, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, respectivamente.

(2) Coeficiente de correlação (r) = -0,9923; equação da reta ( y= ax + b ): y = -0,8408x + 98,80

(3) Coeficiente de correlação (r) = -0,9712; equação da reta ( log y = ax + b): log y = -0,0050x + 2,0095

(4) Coeficiente de correlação (r) = 0,9728; equação da reta ( 1/y = ax + b ): 1/y = 0,0002x + 0,0094

Tabela 15: Teores percentuais teóricos calculados para as amostras submetidas à temperatura de 80°C, considerando-se diferentes ordens de reação.

TOMADA DE AMOSTRA <sup>(1)</sup>	REAÇÃO DE ORDEM ZERO <sup>(2)</sup>	REAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM <sup>(3)</sup>	REAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM <sup>(4)</sup>
T <sub>0</sub>	93,55%	98,28%	112,52%
T <sub>1</sub>	87,25%	88,22%	91,64%
T <sub>2</sub>	77,80%	75,04%	71,68%
T <sub>3</sub>	71,49%	67,36%	62,59%
T <sub>4</sub>	49,44%	46,17%	43,35%
T <sub>5</sub>	27,38%	31,64%	33,16%

(1) As tomadas de amostra (T) 0, 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem a 0, 2, 5, 7, 14 e 21 dias, respectivamente.

(2) Coeficiente de correlação (r) = -0,9824; equação da reta ( y = ax + b ): y = -3,15x + 93,55

(3) Coeficiente de correlação (r) = -0,9984; equação da reta ( log y = ax + b): log y = -0,0234x + 1,9924

(4) Coeficiente de correlação (r) = 0,9868; equação da reta ( 1/y = ax + b ): 1/y = 0,0010 x + 0,0089



As figuras 21 e 22 exibem as representações gráficas das curvas de degradação, para as temperaturas de 60°C e 80°C.

Com base na análise dos coeficientes de correlação, calculados através de regressão linear dos dados obtidos para as temperaturas de 60°C e 80°C e apresentados nas tabelas 14 e 15, foi possível a determinação das respectivas ordens de reação. Enquanto na temperatura de 60°C obteve-se valores indicativos de reação de ordem zero, à temperatura de 80°C os dados indicaram a ocorrência de reação de primeira ordem.

A constante da velocidade de degradação ( $k$ ) à temperatura de 60°C apresentou valor de 0,8408, sendo que para a temperatura de 80°C este valor foi de 0,0540. As equações utilizadas para a obtenção destes dados estão indicadas a seguir:

- Equação para reação de ordem zero:

$$k = \frac{C_0 - C}{t}$$

Onde:

$C_0$  = Concentração inicial da substância ativa

$C$  = Concentração da substância ativa no tempo "t"

$K$  = Constante de velocidade de reação

$t$  = Tempo, em dias

- Equação para reação de primeira ordem:

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln (C_0/C)$$

Onde:

$\ln C_0$  = Logaritmo natural da concentração inicial da substância ativa

$\ln C$  = Logaritmo natural da concentração no tempo "t"

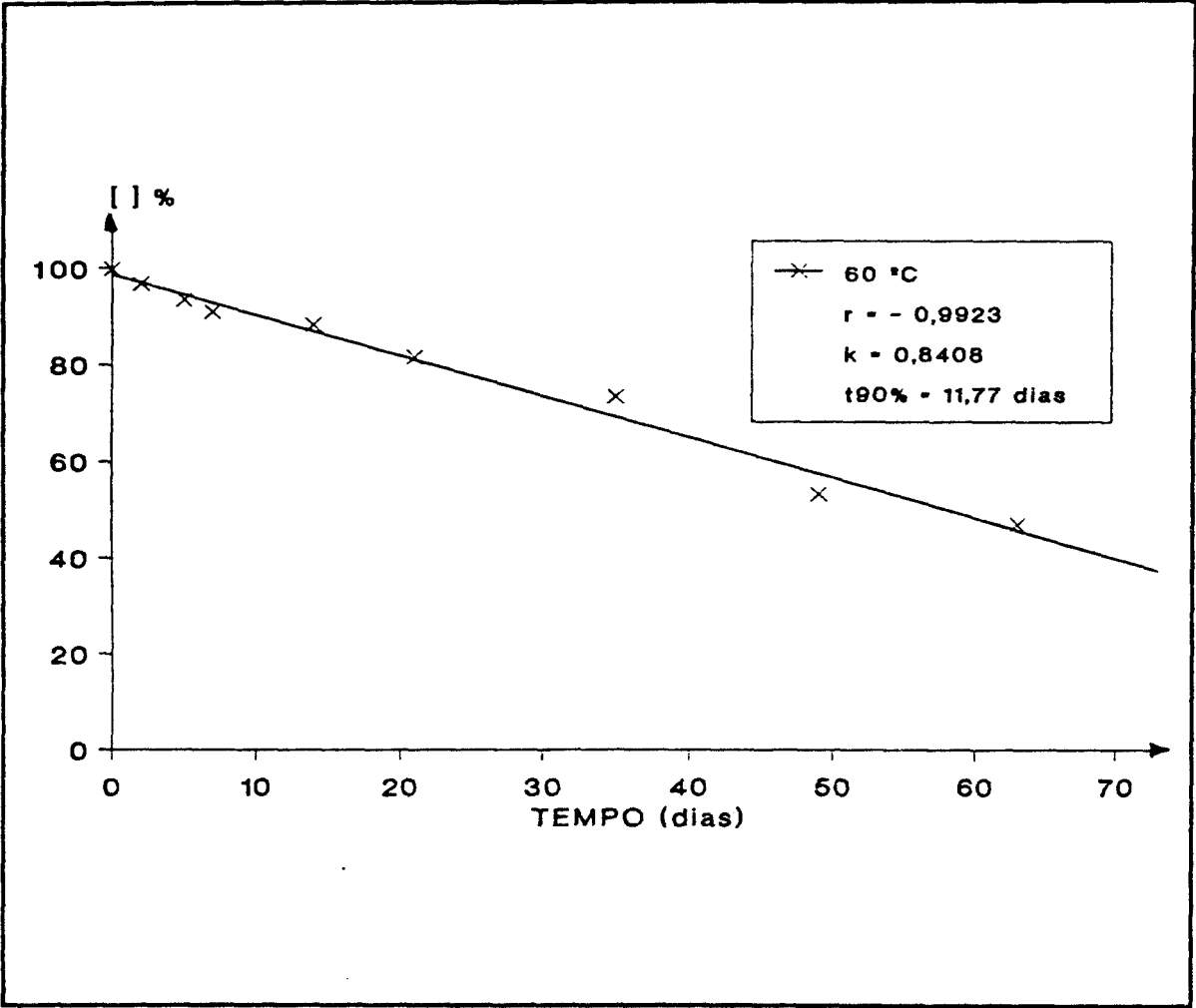
$k$  = Constante de velocidade de reação

$t$  = Tempo, em dias

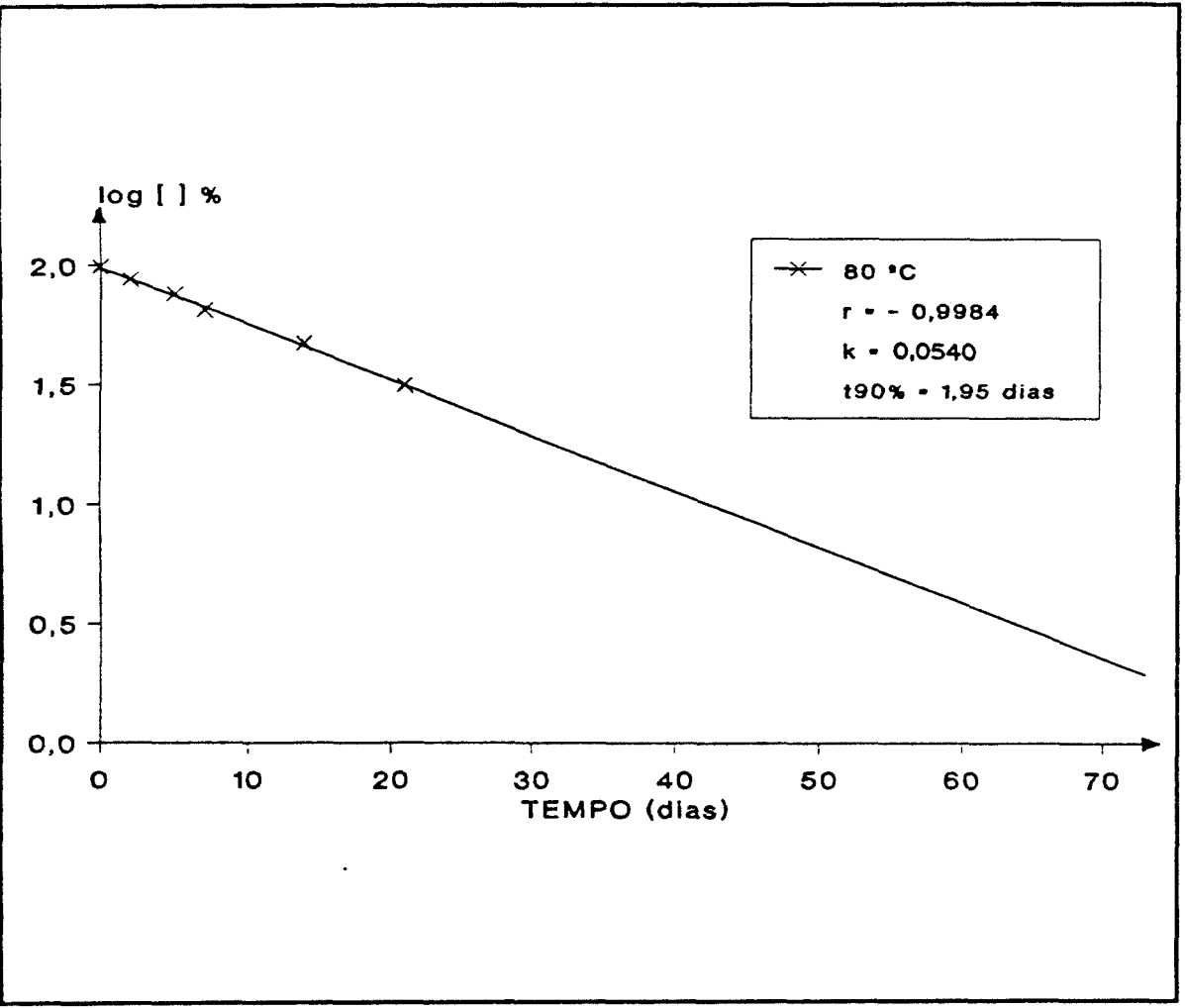
A partir dos valores da velocidade de degradação para as temperaturas de 60 °C e 80 °C e do conhecimento das respectivas ordens de reação, calculou-se o tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) dos comprimidos para cada uma destas condições experimentais. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir:

- Calor seco (60°C)  $\Rightarrow$   $t_{90\%} = 11,77$  dias
- Calor seco (80°C)  $\Rightarrow$   $t_{90\%} = 1,95$  dias

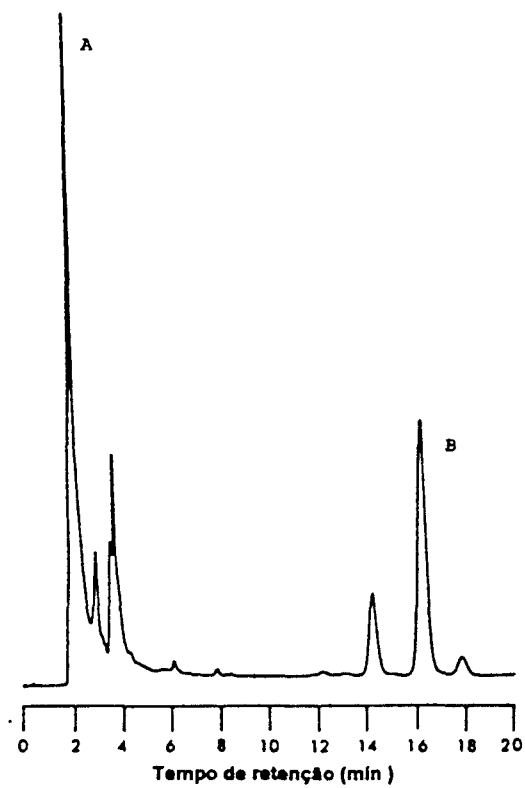
A figura 23 apresenta um cromatograma obtido com amostra degradada a 80 °C.



**Figura 21:** Representação gráfica da curva de degradação térmica do maleato de enalapril, à temperatura de 60°C.



**Figura 22:** Representação gráfica da curva de degradação térmica do maleato de enalapril, à temperatura de 80°C.



**Figura 23:** Cromatograma de amostra de maleato de enalapril degradada à temperatura de 80°C, obtido através de CLAE.

- (A) Ácido maleico
- (B) Derivado dicetopiperazínico

3.4.2. Estabilidade frente à umidade

O acompanhamento da degradação frente à umidade, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência proposto, forneceu os valores percentuais apresentados na tabela 16, para as diferentes umidades relativas (UR) empregadas.

A observação macroscópica, após o período de exposição às diferentes condições experimentais utilizadas, não demonstrou qualquer alteração nas características organolépticas das amostras.

Tabela 16: Teores percentuais obtidos no estudo da estabilidade frente a diferentes umidades relativas(UR), para comprimidos de maleato de enalapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

UMIDADE RELATIVA TOMADA DE AMOSTRA <sup>1</sup>	30 % TEOR % <sup>2</sup>	60 % TEOR % <sup>2</sup>	90 % TEOR % <sup>2</sup>
T <sub>0</sub>	99,86	99,86	99,86
T <sub>1</sub>	99,71	99,30	99,03
T <sub>2</sub>	99,74	99,30	98,91
T <sub>3</sub>	99,73	99,30	98,42
T <sub>4</sub>	99,70	99,12	98,31
T <sub>5</sub>	99,76	99,14	99,12
T <sub>6</sub>	99,66	99,13	99,05

( 1 ) As tomadas de amostra (T) 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem a 0, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, respectivamente.

( 2 ) Cada valor representa a média de 6 determinações

3.4.3. Estabilidade fotoquímica

Os valores obtidos para o acompanhamento da degradação fotoquímica, nas condições experimentais empregadas, estão apresentados na tabela 17. Considerando-se que o ensaio foi proposto como estudo preliminar, do tipo "tudo ou nada", realizou-se 6 determinações, utilizando-se as amostras descritas no Item 2.2.3.3..

A observação macroscópica das amostras, após o período de exposição à radiação ultravioleta, não demonstrou qualquer alteração das características organolépticas.

Tabela 17: Valores obtidos na avaliação da degradação fotoquímica de comprimidos de maleato de enalapril 20 mg, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

ENSAIO	TEOR (%)	MÉDIA ± e.p.m.	CV %
1	99,82		
2	99,70		
3	100,12	99,89 ± 0,08	0,22
4	99,65		
5	100,18		
6	99,84		

T<sub>o</sub> = 99,86 %





A avaliação da qualidade de um medicamento envolve não somente a adoção de critérios objetivos, tais como testes de identificação, ensaios de pureza, determinação de peso ou volume e uniformidade de conteúdo. Critérios subjetivos como aparência, cor e odor, embora não possam ser caracterizados como medidas analíticas, contribuem de forma significativa para a garantia da qualidade (CONNORS, 1980; PIANETTI, 1986).

A aparência visual é um parâmetro subjetivo a ser considerado, uma vez que pode fornecer informações sobre os métodos de fabricação utilizados. No exame visual de comprimidos é importante a verificação da regularidade de cor, já que este critério pode fornecer indicações sobre a homogeneidade do complexo farmacêutico utilizado para compressão, bem como indicar uma possível reação de algum dos integrantes da formulação com o aço dos punções ou das matrizes (PRISTA et al., 1981). Por outro lado, a análise do comprimido quanto à integridade, regularidade dos bordos, presença de estrias e pó sobre a superfície, pode informar sobre o balanceamento correto dos componentes da formulação, condições do equipamento utilizado e emprego de técnicas adequadas de fabricação (DALLA COSTA, 1990).

Os comprimidos utilizados neste estudo, após análise visual, apresentaram coloração homogênea e aspecto íntegro, não sendo possível qualquer inferência sobre problemas decorrentes do processo de fabricação.

A determinação das dimensões dos comprimidos apresenta-se como característica importante, visto que também pode indicar problemas inerentes aos procedimentos físicos envolvidos na elaboração da forma farmacêutica. Como os comprimidos são preparados com uma certa quantidade de granulado de tenacidade estabelecida e sofrem uma determinada força de compressão, a medida de sua espessura é um critério a ser considerado (PRISTA et al., 1981). Variações

significativas na espessura podem resultar de problemas na alimentação da matriz da máquina de comprimir, o que acarreta alterações na textura individual dos comprimidos e, por consequência, na dureza e no respectivo tempo de desintegração (HELMAN, 1981). Entretanto, mesmo em presença de variações na espessura, o peso dos comprimidos pode permanecer inalterado. Este fato relaciona-se diretamente com a existência de diferenças na densidade do complexo farmacêutico, com a pressão aplicada e/ou com a velocidade de compressão empregada (GENNARO, 1985). A verificação das dimensões dos comprimidos utilizados neste estudo, cujos resultados estão apresentados na tabela 4, demonstrou existir homogeneidade quanto aos critérios analisados. Portanto, parece improvável a ocorrência de alterações significativas na dureza e no tempo de desintegração.

A tolerância de variação de peso é função do peso teórico dos comprimidos. O limite de variação para comprimidos com peso médio ou valor nominal declarado entre 80 e 250 mg, situa-se na ordem de 7,5% (F. Bras. IV). Os comprimidos submetidos à análise apresentaram-se compatíveis com as especificações farmacopeicas, conforme os dados apresentados na tabela 4 e figura 10.

A resistência mecânica dos comprimidos ao esmagamento ou à penetração, axial ou radial, é de fundamental importância para a manutenção de sua integridade antes e durante as operações de acondicionamento, bem como durante o transporte, armazenagem e manuseio pelo paciente (HELMAN, 1981; PRISTA et al., 1981; PIANETTI, 1986). A dureza de um comprimido é função da porosidade e da força de compressão, sendo característica indicativa do tempo de desintegração. Assim, quanto maior a força de compressão aplicada, maiores serão as superfícies de contato entre as partículas, as superfícies de adesão interparticulares e, por consequência, menor será a porosidade do comprimido. Todavia, embora a diminuição

da porosidade possa resultar em redução da velocidade de desagregação e dissolução da substância ativa, a penetração dos líquidos é uma função do diâmetro médio e da distribuição dos poros (PRISTA et al., 1981; AIACHE et al., 1983). Desse modo, comprimidos submetidos a uma elevada força de compressão, mas que possuem pequenos poros preenchidos com desagregantes de caráter hidrofílico, podem apresentar tempo de desagregação inalterado. Neste caso, a rápida penetração de água é explicável, uma vez que a pressão capilar é inversamente proporcional ao diâmetro dos poros (AIACHE et al., 1983).

A determinação da dureza dos comprimidos de maleato de enalapril forneceu resultados compatíveis com a especificação farmacopeica (F. Bras. IV), segundo a qual os comprimidos devem resistir a uma força de, no mínimo, 3 kgf/cm<sup>2</sup>. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 4 e figura 11 (páginas 75 e 76).

A resistência de um comprimido depende de vários fatores, tais como a coesão dos componentes, aglutinantes utilizados, tipo de granulação executada, tamanho e forma dos grânulos, lubrificante empregado, tamanho e forma dos comprimidos, estado dos punções e das matrizes, entre outros (PRISTA et al., 1981).

Considerando-se os atritos a que são submetidos os comprimidos durante o acondicionamento, armazenagem, transporte e manuseio, torna-se importante verificar a resistência destes ao rolamento e queda. A friabilidade é, portanto, a falta de resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica. Os comprimidos submetidos à avaliação apresentaram friabilidade condizente com as especificações da F. Bras. IV.

Muitos estudos têm comprovado que a umidade é uma das variáveis que afetam mais significativamente a estabilidade química de formas farmacêuticas sólidas. Além de afetar diretamente as decomposições hidrolíticas, a

umidade pode ser considerada como fator importante nas degradações oxidativas e fotoquímicas, a que estão sujeitas inúmeras substâncias em estado sólido (CONNORS et al., 1986).

Por outro lado, somada à promoção de interações químicas entre os componentes da formulação, a umidade residual é capaz de interferir sobre as características tecnológicas, tais como a distribuição granulométrica ou a qualidade de fluxo durante a preparação da forma farmacêutica (DALLA COSTA, 1990).

Embora a respectiva monografia não indique a necessidade de determinação do teor de umidade para os comprimidos de maleato de enalapril (USP XXII), executou-se sua quantificação, através do método volumétrico de Karl - Fischer, tendo em vista a realização de estudo da estabilidade frente a diferentes umidades relativas. O resultado obtido está apresentado na tabela 4.

As substâncias ativas incorporadas nos comprimidos são absorvidas apenas quando estes se desintegram, ou se dissolvem, de forma mais ou menos rápida (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Pelo conceito de desintegração de um comprimido, entende-se a dissolução completa ou a desagregação da forma farmacêutica, resultando nos pós, misturas de pós ou grânulos utilizados em sua elaboração (PRISTA et al., 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

A desintegração compreende duas fases distintas, sendo que na primeira ocorre a desintegração até aos grânulos que originaram o comprimido e, na segunda, estes grânulos desintegram-se, resultando no pó empregado para prepará-los (PRISTA et al., 1981). Estas duas etapas devem ocorrer no período de tempo necessário para a digestão, avaliado entre 3 ou 4 horas. Todavia, considerando-se que certos medicamentos devem atuar mais rapidamente, verifica-se na literatura a adoção

de período de desintegração sensivelmente inferior àquele exigido para a digestão (KNAPP, 1977; VAIZOGLU, 1981).

O tempo de desintegração pode ser afetado pelas propriedades físicas e químicas do granulado, pela porosidade da forma farmacêutica, pelo efeito do desintegrante empregado na formulação, bem como pela força de compressão utilizada na elaboração do comprimido (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; LIEBERMAN et al., 1990).

O teste de desintegração dos comprimidos de maleato de enalapril, realizado conforme descrito pela F. Bras. IV, forneceu resultados compatíveis com as especificações farmacopeicas.

Os resultados obtidos nos testes de identificação do maleato de enalapril, possibilitaram a caracterização da substância ativa presente nos comprimidos, de acordo com os parâmetros descritos na literatura (PATCHETT et al., 1980; IP & BRENNER, 1987; OKLOBDIZIJA et al., 1988; BUDAVARI, 1989; USP XXII).

A eleição de um método adequado para a realização de uma análise quantitativa depende de uma série de fatores, tais como a quantidade de amostra disponível, a faixa da quantidade relativa em que, presumivelmente, está situado componente a determinar, a exatidão requerida, a composição química da amostra, o número de amostras a analisar e os recursos disponíveis (OHLWEILER, 1984).

Em termos ideais, o método de quantificação deveria expressar o perfeito equilíbrio entre critérios como seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo operacional. Entretanto, nas análises de rotina, sempre que haja certa tolerância quanto à exatidão, a escolha deve recair sobre métodos simples e rápidos,

resultantes da harmonização adequada entre exatidão, de um lado, e tempo e trabalho dispendidos do outro.

A utilidade da análise quantitativa compreende o exame das matérias-primas, o controle das várias fases da produção e a avaliação da qualidade dos produtos parcial ou totalmente acabados. Neste aspecto, cabe ressaltar a importância do permanente trabalho de pesquisa, envolvendo o uso de métodos analíticos em estudos relacionados com o emprego de novos processos tecnológicos, a melhoria dos padrões de qualidade dos produtos e a elaboração de novos métodos analíticos de controle (OHLWEILER, 1984).

A monografia do maleato de enalapril (USP XXII) preconiza a utilização de CLAE para a quantificação da substância, tanto sob a forma de matéria-prima como em comprimidos. Entretanto, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer alternativas ao método farmacopeico, uma vez que o baixo pH da fase móvel (pH 2,0) e a elevada temperatura (70 a 80°C) tendem a diminuir a vida útil das colunas (KATO, 1985). Por outro lado, utilizando-se as condições especificadas pela referida farmacopéia, o controle estrito da temperatura assume característica fundamental, já que variações neste parâmetro podem resultar na obtenção de dois picos, correspondentes aos dois isômeros conformacionais do enalapril. Da mesma forma, a elevação do pH da fase móvel indicada na respectiva monografia, além de produzir alterações significativas nos tempos de retenção, também possibilita a separação dos citados isômeros conformacionais. A influência da temperatura sobre os tempos de retenção não parece ser significativa, embora a forma do pico de enalapril (base) possa sofrer alterações (SALAMOUN & SLAIS, 1991).

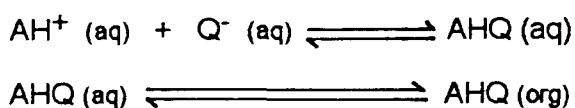
No presente estudo, considerando-se a metodologia descrita na monografia do fármaco, as dificuldades adicionais de sua aplicação como método rotineiro para o controle de qualidade da referida substância ativa e a omissão ou

apresentação incompleta dos dados referentes a alguns dos métodos alternativos descritos na literatura, optou-se por avaliar a possibilidade do emprego de outros métodos de quantificação. Entretanto, tal opção não foi caracterizada como excludente, uma vez que a verificação de possíveis adaptações nas metodologias já relatadas constituiu ponto importante durante a elaboração da proposta de trabalho.

Inicialmente, procedeu-se a adaptação do método proposto por KATO (1985), baseado na determinação espectrofotométrica do par iônico formado entre enalapril e azul de bromotimol, empregando um sistema fechado de injeção de fluxo.

Um par iônico é resultado da associação entre um íon positivo e outro negativo, quando em solução. A formação de tais pares representa papel importante na química tanto de substâncias orgânicas como inorgânicas, sendo que, em alguns casos, estes podem ser isolados e suas estruturas determinadas (SCHIRMER, 1982).

No caso de cátions ou ânions orgânicos relativamente volumosos, as cargas iônicas podem estar protegidas de tal forma pelo solvente, que o complexo apresenta-se solúvel em solventes de baixa polaridade. O equilíbrio fundamental envolvido na extração de um par iônico por uma base orgânica, pode ser representado pelas seguintes equações:





Onde:

$AH^+$  = base protonizada

$Q^-$  = contra-íon

$AHQ$  = par iônico neutro

As mesmas equações podem ser aplicadas à extração de ácidos orgânicos, através do emprego de contra-íon catiônico.

Vários fatores devem ser considerados na escolha de um contra-íon para se proceder a extração de um par iônico. Um substrato doador de prótons deve ser extraído através da utilização de solvente e contra-íon aceptores de prótons, enquanto que substratos aceptores de prótons necessitam de solvente e contra-íon doadores de prótons. Assim sendo, percebe-se que a eleição de um contra-íon depende da faixa de pH onde este apresenta grau de ionização semelhante àquele da substância a ser extraída (HULL & BILES, 1964; DAS GUPTA & CADWALLADER, 1968; DAS GUPTA et al., 1968; DAS GUPTA & HERMAN, 1973; SCHIRMER, 1982).

O tamanho e a polaridade dos substituintes presentes em um contra-íon também são determinantes importantes da eficiência da extração. Em geral, grupos não-polares volumosos aumentam o coeficiente de partição para o par iônico no solvente orgânico, enquanto que grupos menores ou com caráter polar promovem uma redução deste coeficiente (SCHIRMER, 1982).

Muitos métodos têm sido relatados para a determinação quantitativa de aminas e sais de amônio quaternário, os quais formam pares iônicos coloridos por reação com certos ácidos sulfônicos. Estes pares são extraídos de soluções aquosas com o auxílio de solventes orgânicos e submetidos à determinação espectrofotométrica (DAS GUPTA, 1971). Dentre estes métodos destacam-se aqueles utilizados para a análise de tiamina, atropina, codeína, emetina, efedrina, pilocarpina,

procaína, quinina, estriçnina e maleato de clorfeniramina, empregando azul de bromotimol como contra-íon (DAS GUPTA & CADWALLADER, 1968; DAS GUPTA, 1971; SCHIRMER, 1982). Nestes estudos, foram determinados o balanço estequiométrico e as constantes de estabilidade dos complexos formados, utilizando clorofórmio como solvente (DAS GUPTA, 1971). A variação na quantidade de complexos amina/azul de bromotimol, extraídos de uma solução aquosa por um solvente orgânico, é dependente do pH da fase aquosa. Dados experimentais indicam que a faixa de pH mais adequada à maior sensibilidade do método analítico situa-se entre 5,2 e 6,4 (DAS GUPTA & HERMAN, 1973; SCHIRMER, 1982).

O enalapril é uma amina secundária e forma íons associados com sulfoftaleínas como azul de bromotimol, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol e azul de bromofenol. Os pares iônicos amarelos são extraídos quantitativamente em diclorometano e clorofórmio (KATO, 1985).

Segundo dados apresentados por KATO (1985), a utilização de azul de bromotimol como contra-íon e diclorometano como solvente foi decorrente de sua solubilidade, sensibilidade e baixo custo. Ao contrário dos relatos de DAS GUPTA & HERMAN (1973), o autor acima citado sugere que a faixa de pH ideal para a extração do par iônico enalapril/azul de bromotimol, empregando diclorometano, está compreendida entre 3,0 e 4,0. Este autor utilizou tampão acetato de sódio/HCl, pH 3,2, como fase aquosa.

Ainda conforme o relato de KATO (1985), os principais produtos de degradação do enalapril não interferem na quantificação. O derivado dicetopiperazínico não apresenta grupos básicos capazes de associação com azul de bromotimol. Embora o enalaprilato possa formar pares iônicos com o contra-íon, estes não são extraídos pelo diclorometano devido à presença de dois grupos carboxila em sua estrutura. Da mesma forma, excipientes comumente empregados em comprimidos, tais como açúcares,

celulose e estearato de magnésio também não interferem na determinação. Segundo o autor, o método é útil para a avaliação da estabilidade do enalapril e para o controle de qualidade de especialidades farmacêuticas que o contenham. Por outro lado, o método apresenta resultados superiores àqueles obtidos por CLAE, além da simplificação do instrumental utilizado. A estas características o autor acrescenta vantagens como a análise rápida de elevado número de amostras, economia no uso de reagentes e diminuição da exposição aos vapores de solventes orgânicos, uma vez que a formação do par iônico, sua determinação espectrofotométrica e a recuperação dos solventes são executados em sistema de fluxo fechado.

Embora o método descrito acima possa ser considerado alternativo em relação à CLAE, a necessidade de aquisição de autoanalisadores também representa custos adicionais, nem sempre compensadores para alguns laboratórios devido ao reduzido número de análises a serem realizadas. Assim, optou-se, no presente trabalho, por avaliar a possibilidade de emprego do pareamento iônico através de extração manual.

De acordo com os dados apresentados na tabela 6 (página 84), observou-se que as absorvâncias determinadas para as diferentes concentrações de solução padrão apresentaram coeficientes de variação percentual bastante elevados. A análise da variância (ANOVA) dos valores de absorvância obtidos, cujos elementos estão presentes na tabela 7 (página 85), indica que houve diferença significativa entre as absorvâncias determinadas para as concentrações utilizadas, para  $p < 0,05$ . Entretanto, embora a regressão linear tenha sido significativa, o desvio da linearidade foi estatisticamente significativo, para  $p < 0,05$ . Esta observação é compatível com o coeficiente de correlação obtido para a curva padrão (0,9091), cuja representação gráfica está indicada na figura 16 (página 86). Assim, com base nestes resultados, o método não apresentou as características exigidas para sua utilização como método quantitativo, nas

condições experimentais empregadas. A elevada variação observada pode ser decorrente do rápido decréscimo da absorvância do par iônico após sua formação, bem como de problemas inerentes ao processo de extração manual. Por outro lado, há a possibilidade de interferência de íons metálicos, os quais podem ser extraídos por solventes orgânicos a partir de soluções ácidas contendo altas concentrações de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  ou uma variedade de ânions orgânicos. A presença destes íons poderia ser capaz de resultar em equilíbrios adicionais, levando à existência de várias espécies iônicas e ocorrência de diversos complexos, simultaneamente à formação do par iônico entre enalapril e azul de bromotímol, cuja determinação espectrofotométrica estaria, neste caso, comprometida. Estudos posteriores são necessários para avaliar a interferência destes diferentes fatores.

Verificou-se, também, a viabilidade de utilização de espectrofotometria para a determinação quantitativa de um possível complexo, formado a partir da reação entre enalapril e sulfato de cobre.

O termo "complexo" foi originalmente empregado para designar os compostos formados através da combinação de espécies químicas capazes, elas próprias, de existência independente (OHLWEILER, 1984).

Os compostos de coordenação, também chamados de complexos metálicos ou simplesmente complexos, são compostos que contêm um átomo ou íon central, geralmente um metal, rodeado por um grupo de moléculas ou íons, os quais tendem a manter sua identidade, ainda que em solução (BASOLO & JOHNSON, 1978).

Em geral, entende-se uma reação de complexação como uma reação em que um íon simples é transformado em íon complexo. Nas soluções de sais metálicos, os íons se encontram solvatados, embora as moléculas do solvente possam estar apenas mais ou menos firmemente ligadas ao íon central. Desse modo, uma reação de complexação geralmente compreende a substituição de uma ou mais moléculas do

solvente ligadas ao íon, por outros grupos ligantes. O ligante pode ser uma espécie molecular ou uma espécie iônica, sendo que os aquo-grupos remanescentes no complexo podem ser sucessivamente substituídos por outros grupos, até que a formação do complexo esteja completa. Quando um metal forma um íon complexo, o número máximo de ligantes representa o número de coordenação do íon metálico (OHLWEILER, 1984).

Os anéis heterocíclicos resultantes da complexação de um íon metálico com dois ou mais grupos funcionais da mesma molécula ligante são chamados anéis queláticos. A molécula orgânica é designada agente quelante e o complexo recebe a denominação de quelato. Um exemplo típico de tal complexação pode ser representado pela molécula de trietilenotetramina (Figura 24), a qual contém quatro átomos de nitrogênio ligados por pontes etilênicas e são capazes de satisfazer, em um único estágio, ao número de coordenação normal do cobre (BASOLO & JOHNSON, 1978; OHLWEILER, 1984). Entretanto, quando vários ligantes se fixam ao átomo metálico central, a formação do complexo envolve sucessivas etapas, sendo que o equilíbrio é determinado por tantas constantes de formação quantas sejam as espécies complexas em questão (OHLWEILER, 1984).

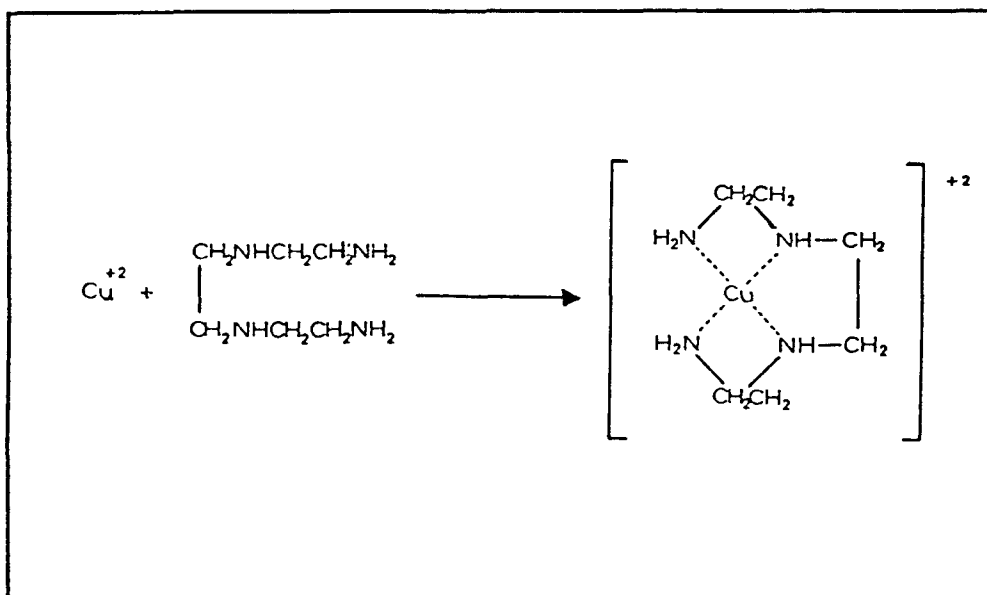
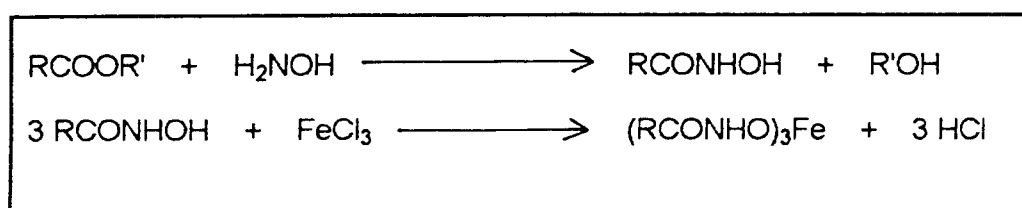


Figura 24: Complexação de cobre com trietenotetramina

Considerando-se que os aminoácidos são capazes de formar complexos com metais de transição, particularmente com o cobre (LI & DOODY, 1950; KLAGES, 1968; EVANGELISTA, 1981), e tendo o enalapril uma estrutura dipeptídica derivada dos aminoácidos alanina e prolina, esperava-se que a reação entre este e o sulfato de cobre resultasse na formação de complexo metálico, passível de quantificação através de espectrofotometria. Entretanto, nas condições experimentais empregadas, não foi observada a existência de pico de absorção máxima na faixa compreendida entre os comprimentos de onda utilizados, indicando não ter havido formação do complexo esperado.

Sabendo-se que muitas reações de caracterização têm sido utilizadas como fundamento para a proposição de métodos analíticos quantitativos, avaliou-se a utilidade de uma das reações de identificação de ésteres para a quantificação espectrofotométrica do enalapril, já que este apresenta-se como o éster etílico do enalaprilato.

Os ésteres reagem com a hidroxilamina para formar um álcool e um ácido hidroxâmico RCONHOH. Todos os ácidos hidroxâmicos, em soluções ácidas, reagem com cloreto férrico para formar sais complexos coloridos, geralmente violáceos (VOGEL, 1979; KOROLKOVAS, 1984; ALLINGER, 1985). As reações se processam conforme apresentado na figura 25 (VOGEL, 1979).



**Figura 25:** Reações gerais para o ensaio do ácido hidroxâmico

Após a execução do ensaio preliminar descrito por VOGEL (1979), cujo resultado negativo indicou a inexistência de interferentes capazes de reagir diretamente com o cloreto férrico e mascarar a possível reação entre enalapril e hidroxilamina, procedeu-se ao ensaio propriamente dito.

Embora se tenha verificado o aparecimento de leve coloração violácea ao final da reação preconizada, a determinação espectrofotométrica entre os comprimentos de onda 380 nm e 780 nm não evidenciou a presença de pico de absorção máxima. Registrou-se um pico a 660 nm, de baixa intensidade, o qual também foi observado no espectro obtido com o branco correspondente. Estes resultados sugerem que a reação entre enalapril e hidroxilamina não resultou na formação do complexo esperado. Foram verificados parâmetros como variações nas concentrações dos reagentes, pH do meio de reação e tempo decorrido entre o início da reação e a execução das leituras espectrofotométricas. Considerando-se que os

ensaios preliminares não evidenciaram a existência de possíveis interferentes e que a alteração de diversos fatores não forneceu resultados satisfatórios, a não formação do complexo metálico poderia ser resultado da interferência de fatores estereoquímicos relacionados à molécula de enalapril. Desse modo, nas condições experimentais descritas, não foi possível a utilização do ensaio do ácido hidroxâmico como fundamento para a análise quantitativa do maleato de enalapril.

Avaliou-se a aplicabilidade do método fluorimétrico para a determinação quantitativa do maleato de enalapril, empregando-se o cloreto de NBD como reagente fluorogênico.

A fluorescência é causada pela absorção de energia radiante e reemissão, de uma grande parte desta, sob a forma de radiação visível. A luz emitida tem, sempre, comprimento de onda maior do que aquele da radiação absorvida (VOGEL, 1986).

As substâncias ditas fluorescentes, quando expostas à radiação ultravioleta, visível ou outras também de natureza eletromagnética, apresentam excitação dos elétrons das moléculas para níveis energéticos mais elevados. Após curta permanência no estado excitado, cerca de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  segundos, os elétrons reverterem ao estado fundamental por meio de processo não radiativo, denominado desativação por colisão, aliado a processo radiativo chamado luminiscência, ao contrário do que ocorre com a maioria das substâncias em que a reversão não compreende emissão de luz (F. BRAS. IV). O termo luminiscência ou fotoluminiscência é o termo geral que se aplica ao processo de absorção e reemissão da energia luminosa, englobando os fenômenos designados por fluorescência e fosforescência. Estes dois fenômenos podem ser considerados como idênticos, apresentando apenas uma diferença de grau. Enquanto na verdadeira fluorescência a absorção e a emissão se processam num tempo curto, mas mensurável, na fosforescência a luz é emitida com um



retardamento que pode variar de uma fração de segundo até muitas semanas (VOGEL, 1986). Assim, sendo de natureza fluorescente, a radiação emitida pela substância cessa quando a fonte de energia é retirada e esta característica a distingue da fosforescência, que prossegue por algum tempo após o término da excitação (F. BRAS. IV).

Embora a fluorescência possa ser afetada pelo pH da solução, pela natureza do solvente empregado e, em alguns casos, pela temperatura (VOGEL, 1986), a sua obtenção depende principalmente do par de filtros utilizado no aparelho. A luz se distribui uniformemente atingindo o filtro primário, cuja função é produzir um feixe que inclua a faixa de comprimentos de onda desejada. Este filtro emite as radiações que serão absorvidas pela amostra, a qual passa a emitir fluorescência em todas as direções, sendo selecionada pelo filtro secundário, responsável pela transmissão da máxima fluorescência (VOGEL, 1986; VAUCHER, 1987). Este processo resulta na obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência. O primeiro representa a eficiência relativa dos diferentes comprimentos de onda da radiação excitadora, enquanto que o segundo representa as potências relativas da fluorescência para estes comprimentos de onda. A utilização de espectrofluorômetros é ideal para se obter o registro do espectro de fluorescência de uma determinada substância, com o objetivo de selecionar entre as diferentes combinações de pares de filtros aquela que proporcione máxima absorção e transmissão por parte da amostra (WILLARD et al., 1979; CONNORS, 1980; VOGUEL, 1986; VAUCHER, 1987). A figura 26 apresenta um exemplo de espectros de excitação e emissão de uma espécie fluorescente (VAUCHER, 1987).

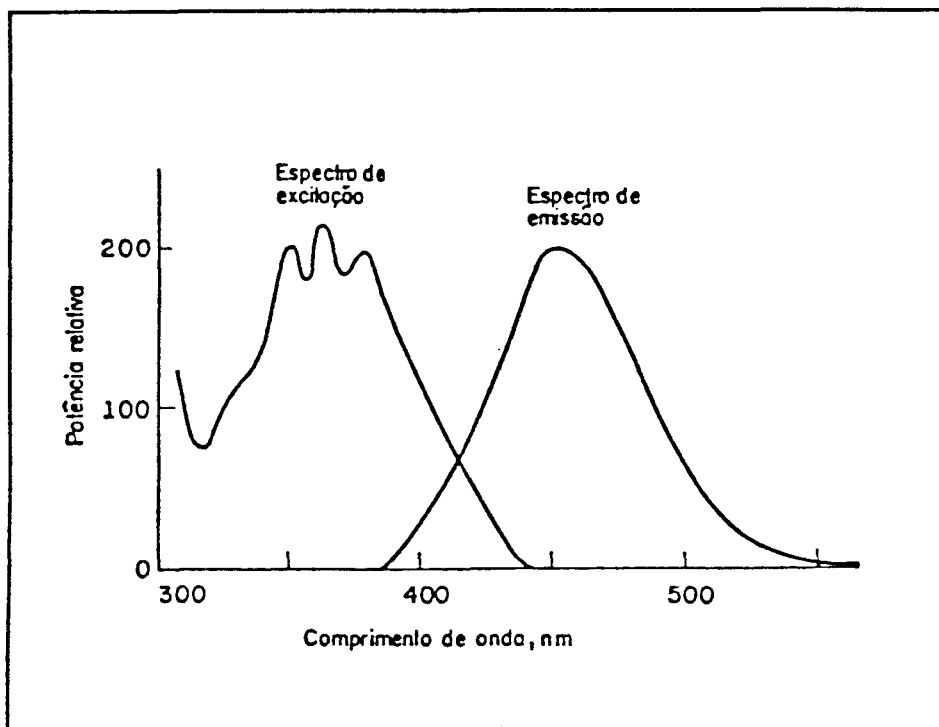


Figura 26: Espectros de excitação e emissão de uma espécie fluorescente

O cloreto de NBD (7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol), cuja estrutura química está apresentada na figura 27, é um reagente fluorogênico bastante estável e específico para grupos amino, formando derivados fluorescentes também estáveis quando protegidos da luz (GHOSH & WHITEHOUSE, 1968; CAMPOS, 1980; EVANGELISTA, 1981; VAUCHER, 1987).

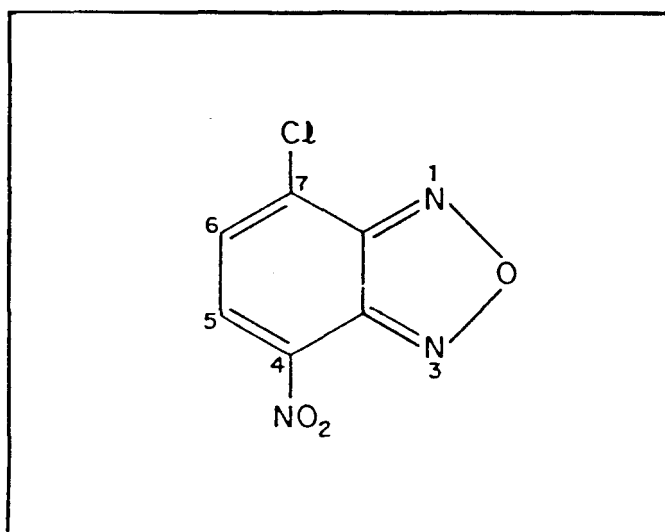


Figura 27: Estrutura química do cloreto de NBD

A reação de cloreto de NBD com aminas primárias e secundárias resulta na formação de compostos altamente fluorescentes, em consequência do deslocamento do átomo de cloro ligado ao carbono da posição 7 do reagente fluorogênico pelo grupo amino, com a respectiva liberação de ácido clorídrico. A reação está apresentada na figura 28 (GHOSH & WHITEHOUSE, 1968; CAMPOS, 1980; EVANGELISTA, 1981; VAUCHER, 1987).

O enalapril, possuindo um grupo amino secundário em sua estrutura, apresenta possibilidade de reação com o cloreto de NBD e conseqüente formação de produto fluorescente.

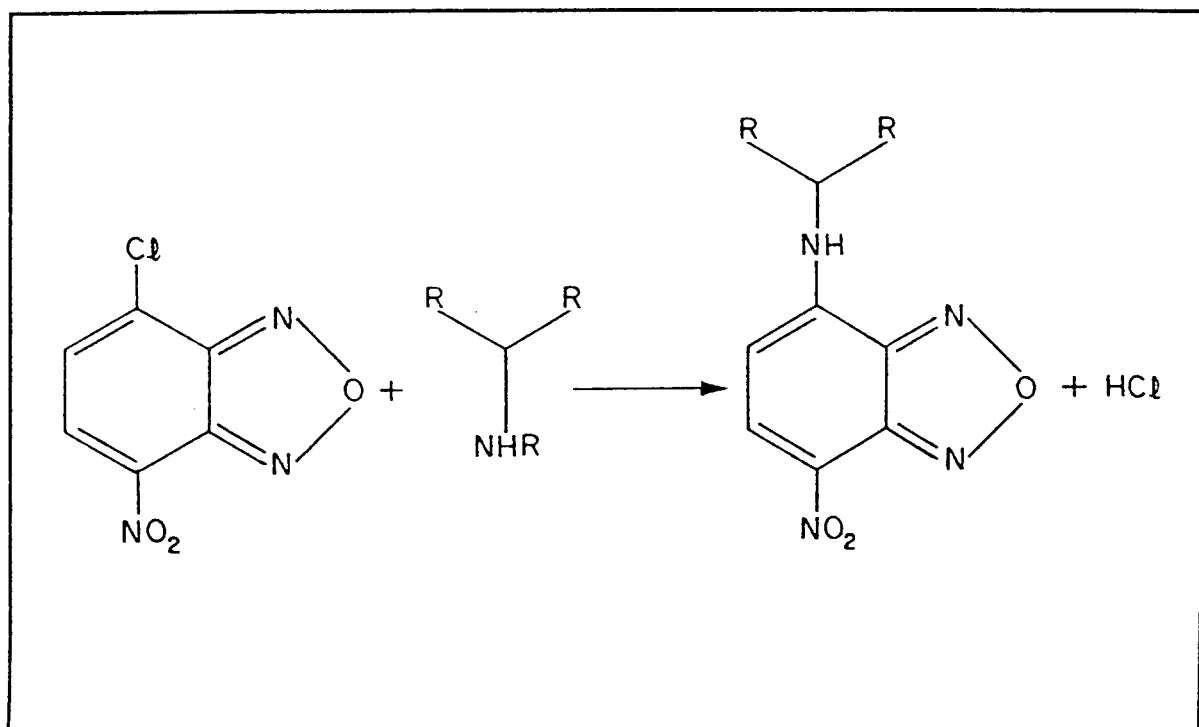


Figura 28: Reação geral para o cloreto de NBD e aminas

As reações envolvendo o cloreto de NBD devem ser realizadas, preferencialmente, em meio anidro (BENJAMIN et al., 1973), uma vez que os produtos formados apresentam diminuição da fluorescência em presença de água. Tal diminuição é decorrente, possivelmente, da formação de pontes de hidrogênio com as moléculas do produto fluorescente (LAWRENCE & FREI, 1972). Desse modo, optou-se por realizar o ensaio fluorimétrico do enalapril tanto em solução metanólica como após desenvolvimento cromatográfico por CCD, empregando-se cloreto de NBD como agente revelador.

Tendo em vista a inexistência de informações sobre os espectros de excitação e emissão do possível complexo fluorescente, a eleição dos filtros primário e secundário capazes de proporcionar maior transmissão de fluorescência, foi executada através de tentativas entre aqueles filtros disponíveis. Das várias

combinações testadas, os filtros nos comprimentos de onda 365 nm e 490 nm foram empregados como filtros primário e secundário, respectivamente. Entretanto, as determinações das percentagens de fluorescência transmitidas pelas soluções não discriminaram as diferentes concentrações de padrão utilizadas, seja no ensaio realizado com a solução metanólica ou após o desenvolvimento cromatográfico. Assim, não foi possível a aplicação do método para a quantificação do maleato de enalapril, nas condições experimentais delineadas. Tais resultados indicam, provavelmente, que os filtros utilizados não sejam os mais adequados para a execução do ensaio, embora diversos outros fatores como pH, temperatura e natureza do solvente, já salientados anteriormente, possam interferir no fenômeno da fluorescência.

Embora não tenha sido possível a realização da análise quantitativa, o cloreto de NBD pode ser utilizado como reativo para a identificação do maleato de enalapril, após desenvolvimento cromatográfico por CCD, uma vez que ocorre a formação de produto de coloração amarela sob luz visível e fluorescência verde sob luz ultravioleta, no comprimento de onda 360 nm.

No ensaio fluorimétrico utilizando o-ftaldialdeído como reagente fluorogênico, originalmente descrito para a quantificação de enalapril e enalaprilato em amostras biológicas (TOCCO et al., 1982), os resultados obtidos não discriminaram as diferentes concentrações de solução padrão, embora se tenha observado a proporcionalidade original entre as concentrações de enalapril e reagente fluorogênico, bem como as condições de pH do meio de reação descritas pelo autor. A alteração das condições experimentais como proporção de reagentes, temperatura, pH e tempo de espera para a execução das leituras, não forneceu melhoria significativa na determinação da percentagem de fluorescência transmitida pelas soluções. Estudos posteriores se fazem necessários, no sentido de verificar outras possibilidades de

interferência, uma vez que esta metodologia parece ser potencialmente valiosa para a análise quantitativa do enalapril.

Em função dos resultados obtidos no estudo dos métodos espectrofotométricos e fluorimétricos citados anteriormente, os quais não foram adequados à determinação quantitativa do maleato de enalapril, procedeu-se a avaliação do método proposto por SIDHU e colaboradores (1987). Segundo este autor, uma variada gama de formulações farmacêuticas, pode ser analisada através de CLAE, utilizando coluna em fase reversa Bondapack C18, mantida à temperatura ambiente, e um sistema binário de solvente constituído de acetonitrila e tampão fosfato de potássio 0,05 *M*. De acordo com o relato do referido autor, o método é simples, reprodutível e pode ser empregado como rotina para a análise quantitativa de diversas formas farmacêuticas, sendo que os procedimentos para extração das diferentes substâncias ativas foram padronizados com sucesso. Dentre as especialidades farmacêuticas analisadas, foram apresentados dados referentes à quantificação do maleato de enalapril presente em comprimidos. Entretanto, apesar de apresentar dados relativos às condições exigidas para o ensaio com enalapril, o autor omite a informação sobre o método de extração utilizado.

Embora sem contar com a informação sobre o método empregado para a extração do maleato de enalapril da forma farmacêutica, optou-se por reproduzir o experimento realizado por SIDHU e colaboradores. (1987). Todavia, mesmo observando as condições descritas e empregando-se diferentes métodos de extração, não foi possível a obtenção de registros cromatográficos adequados. Com base nestes resultados iniciais, executou-se modificações nas proporções dos solventes constituintes da fase móvel, no pH do eluente, no solvente usado para a extração e em parâmetros relacionados à sensibilidade de registro do aparelho.

Após várias tentativas, sempre utilizando soluções de maleato de enalapril padrão como referência, obtiveram-se cromatogramas que possibilitaram a análise quantitativa desejada, empregando-se as condições descritas na tabela 2.

A adequada reprodutibilidade do método pode ser avaliada através do coeficiente de variação percentual médio, cujo valor determinado foi de 0,83%. Este CV% foi calculado a partir dos valores de área absoluta determinados para a obtenção da respectiva curva padrão e apresentados na tabela 8 (página 90). O doseamento do maleato de enalapril presente na forma farmacêutica em estudo, cujos resultados estão apresentados na tabela 10 (página 95), também indica a boa reprodutibilidade do método, sendo que, neste caso, o CV% apresentou valor de 0,32.

A análise da variância dos valores de área absoluta, cujos elementos estão indicados na tabela 9 (página 91), demonstrou que o método foi capaz de discriminar as diferentes concentrações de solução padrão utilizadas, sendo que tais diferenças foram estatisticamente significantes para  $p < 0,01$ . A curva padrão, cuja representação gráfica está indicada na figura 17, apresentou regressão linear significativa para  $p < 0,01$ , sendo que não foi observado desvio significativo da linearidade, para  $p < 0,01$ . O coeficiente de correlação determinado para a reta de calibração foi 0,9997. Estes dados demonstram que a curva padrão pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando a determinação quantitativa do maleato de enalapril.

O sistema apresentou eficiência de separação adequada, verificável pela manutenção dos tempos de retenção dos picos referentes a ácido maleico e enalapril (base), não havendo sobreposição significativa dos mesmos, não comprometendo, dessa forma, a análise quantitativa desejada.

Os valores referentes a fator de resolução da coluna, fator de simetria do pico e número de pratos teóricos, calculados segundo descrito por

LECOMPTE (1986), indicaram que as condições experimentais estabelecidas foram adequadas para a determinação quantitativa do maleato de enalapril. O valor de 507 pratos teóricos, obtido no presente estudo, é cerca de duas vezes superior ao mínimo exigido pela monografia do fármaco, segundo as especificações da USP XXII.

Segundo os dados relativos ao teste de recuperação, apresentados na tabela 11 (página 96), o método adaptado apresentou boa sensibilidade, sendo que as variações observadas foram compatíveis com o valor determinado para o CV% médio do mesmo.

O sistema utilizado demonstrou-se útil para evidenciar a presença tanto de enalaprilato como do derivado dicetopiperazínico, principais produtos de degradação do enalapril. O primeiro apresentou tempo de retenção em torno de 3.7 minutos, enquanto que para o segundo este tempo foi de aproximadamente 16.8 minutos. Os cromatogramas obtidos para estes produtos podem ser observados nas figuras 19 e 20, respectivamente.

Tendo em vista os resultados apresentados pelo método por CLAE, os quais indicaram a viabilidade de seu emprego para a quantificação do maleato de enalapril, tanto sob a forma de matéria-prima como no produto acabado, este foi utilizado para a realização dos estudos de estabilidade.

Os testes de estabilidade acelerada podem ser definidos como os métodos através dos quais pode-se prever a estabilidade de um produto, quando submetidos a diferentes condições de armazenamento, perfeitamente definidas e controladas (YOUNG, 1990).

Entre os fatores que podem alterar um determinado produto com o decorrer do tempo destacam-se : temperatura, umidade, radiações, pressão, oxigênio e outros gases atmosféricos, alterações de pH, agitação, solventes,



contaminação microbiana, materiais de embalagem e método de fabricação utilizado, entre outros (NUDELMAN, 1975; YOUNG, 1990).

Os vários métodos empregados para o estudo do envelhecimento acelerado fundamentam-se na determinação do fator degradante. Uma vez conhecido tal fator, a degradação da substância é provocada através do uso de valores anormalmente elevados deste, ou de outros fatores a ele relacionados. Os resultados obtidos são extrapolados a seus valores normais, com o objetivo de reunir, em tempos relativamente curtos, informações sobre a estabilidade da substância nas condições habituais de conservação (NUDELMAN, 1975).

Em geral, os processos de degradação envolvem reações químicas que consomem energia, sendo acelerados pelo aumento da temperatura (NUDELMAN, 1975; CONNORS, 1986). Entretanto, embora a temperatura seja capaz de acelerar quase todos os processos degradativos, existem alguns sobre os quais esta exerce pouca influência. Entre estes pode-se destacar as reações fotolíticas, cuja energia de ativação é relativamente baixa (2 a 3 kcal/mol) e que não são acelerados significativamente pelo aumento da temperatura. Da mesma forma, algumas reações de oxidação e decomposição nas quais intervêm processos de difusão, também não apresentam elevada sensibilidade às alterações térmicas (NUDELMAN, 1975).

A tabela 12 (página 100) apresenta os valores resultantes da análise dos comprimidos submetidos à degradação térmica. O teor percentual médio, obtido para as amostras não degradadas ( $T_0$ ), foi 99,86 %, utilizando-se o método por CLAE proposto no presente estudo. Analisando-se os dados presentes na referida tabela, percebe-se que a elevação da temperatura foi capaz de acelerar a degradação da substância ativa presente nos comprimidos. Tal degradação foi mais acentuada nas temperaturas de 80°C e 60°C, respectivamente. À temperatura de 40°C, embora

tenha ocorrido degradação, esta foi consideravelmente inferior àquela observada nas demais temperaturas.

Com base nos teores percentuais teóricos, obtidos através do cálculo da regressão linear daqueles valores apresentados na tabela 12, foram determinadas as ordens de reação para as degradações observadas nas temperaturas de 60 °C e 80 °C. Tal determinação foi decorrente da análise dos coeficientes de correlação obtidos para ambas as temperaturas, considerando-se as diferentes possibilidades de ordem de reação, de acordo com os valores apresentados nas tabelas 14 e 15.

Os dados obtidos a partir das amostras submetidas à temperatura de 40 °C não foram utilizados para a definição da ordem de reação, uma vez que a degradação verificada não permitiu a obtenção de valores considerados adequados a esta finalidade. Tal procedimento foi fundamentado nas referências de NUDELMAN (1975), segundo as quais é necessário que nos experimentos cinéticos as reações avancem até se atingir, pelo menos, 50% de degradação. Caso isto não ocorra, os valores obtidos para a velocidade de reação serão muito pouco precisos e geralmente maiores do que o valor real. Por outro lado, é praticamente impossível definir a ordem de reação quando esta avançou apenas 10 ou 20%, sendo que a utilização dos dados de uma reação com o tratamento de uma ordem que não lhe corresponde resulta, inevitavelmente, em erros consideráveis.

Enquanto a degradação observada nas amostras submetidas à temperatura de 60 °C apresentou característica indicativa de reação de ordem zero, os dados obtidos à temperatura de 80 °C indicaram que a degradação comportou-se de acordo com os critérios típicos de reação de primeira ordem. Este fato poderia ser resultado da ocorrência, a 80 °C, de reações de degradação paralelas, envolvendo não apenas o enalapril mas também ácido maleico e outros adjuvantes empregados na

elaboração da forma farmacêutica. Esta inferência está baseada na observação de que as amostras submetidas a esta última temperatura apresentaram alterações acentuadas de coloração após a segunda semana de exposição, bem como nos registros cromatográficos obtidos com as mesmas. Tais cromatogramas, cujo exemplo está apresentado na figura 23, indicam a existência de diversos picos sobrepostos, com tempos de retenção muito próximos àquele correspondente ao ácido maleico. Estes picos são, possivelmente, relativos a produtos resultantes da degradação do próprio ácido maleico, bem como de outras substâncias presentes na formulação.

Tendo em vista as diferentes ordens de reação determinadas para as temperaturas de 60 °C e 80 °C, bem como a degradação insuficiente observada à temperatura de 40 °C, é fundamental a realização de estudos de estabilidade térmica mais prolongados, o que não foi possível no presente trabalho.

Embora o derivado dicetopiperazínico seja o principal produto esperado da degradação térmica do enalapril, resultando de processo de ciclização da molécula original (Figura 2), a análise cromatográfica das amostras degradadas pela temperatura revelou não apenas a presença deste metabólito, cujo tempo de retenção foi de 16.8 minutos. Como mostra a figura 23, além do derivado dicetopiperazínico, observou-se a presença de dois outros picos, com tempos de retenção de 14.8 e 18.5 minutos, respectivamente. É interessante ressaltar que a intensidade do pico em 14.8 minutos aumentou com o avanço da degradação, em proporção semelhante ao decréscimo da intensidade do pico correspondente ao derivado dicetopiperazínico. Tal fato poderia ser decorrente da quebra da ligação éster, presente na estrutura deste último metabólito, originando um derivado cíclico contendo um grupo carbolixa em sua estrutura, o que explicaria a diminuição do referido tempo de retenção e a possível conversão observada. O pico com tempo de retenção de 18.5 minutos permaneceu inalterado com o avanço da degradação. Estudos posteriores serão necessários para o

isolamento e identificação dos dois possíveis produtos de degradação observados, uma vez que este não foi um dos objetivos traçados para o presente trabalho. Contudo, estes dados constituem informação adicional àquelas já apresentadas na literatura, as quais não indicam a separação cromatográfica de outros produtos de degradação além de enalaprilato e derivado dicetopiperazínico.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das amostras submetidas à degradação pela umidade, apresentados na tabela 16 (página 110), demonstraram que estas não sofreram diminuição significativa nos teores de substância ativa, nas condições experimentais empregadas. Considerando-se que os comprimidos foram mantidos em suas embalagens originais e sabendo-se que o maleato de enalapril é propenso à degradação hidrolítica, originando o diácido enalaprilato, a inexistência de degradação frente à umidade indica que a embalagem empregada para o acondicionamento desta formulação farmacêutica foi adequada frente aos parâmetros utilizados.

Segundo os dados apresentados na tabela 17 (página 111), o acompanhamento da degradação frente à radiação ultravioleta não indicou qualquer alteração nos teores percentuais de substância ativa presente nos comprimidos analisados. Da mesma forma, não foram observadas alterações no aspecto das embalagens.

## **V - CONCLUSÕES**

- Os comprimidos de maleato de enalapril cumpriram as especificações dos códigos oficiais quanto ao peso médio, variação de peso, dureza, friabilidade, desintegração, e umidade.
- A substância ativa, presente na forma farmacêutica estudada, foi devidamente identificada através de CCD, espectroscopia na região do infravermelho, ponto de fusão e determinação do poder rotatório.
- Nos comprimidos analisados, os teores percentuais de maleato de enalapril mantiveram-se dentro dos limites preconizados pela USP XXII.
- Os métodos espectrofotométricos por pareamento iônico com azul de bromotimol, pelo sulfato de cobre e pelo cloreto de ferro III, não forneceram resultados satisfatórios para sua utilização como métodos físico-químicos de doseamento do maleato de enalapril, nas condições experimentais delineadas.
- Os métodos fluorimétricos empregando cloreto de NBD e o-ftaldialdeído como reagentes fluorogênicos, não demonstraram ser adequados para a quantificação do maleato de enalapril, nas condições experimentais utilizadas.

- O cloreto de NBD pode ser empregado como reativo de identificação do maleato de enalapril.
- O método por CLAE, adaptado pelo autor e realizado à temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), apresentou resultados compatíveis com sua utilização como método para a quantificação do maleato de enalapril, tanto sob a forma de matéria-prima como produto acabado, bem como para o acompanhamento de sua estabilidade.
- Considerando-se as condições experimentais adotadas, os fatores como umidade relativa e radiação ultravioleta não exerceram influência sobre o processo degradativo do maleato de enalapril, presente na especialidade farmacêutica avaliada.
- Obteve-se degradação significativa das amostras mantidas nas temperaturas de  $60^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ , sendo que os resultados obtidos nestas condições experimentais possibilitaram a determinação da respectiva ordem de reação.
- À temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , a degradação obedeceu cinética de ordem zero, apresentando constante de velocidade de reação igual a 0,8408 e  $t_{90\%}$  igual a 11,77 dias.
- À temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  a degradação obedeceu cinética de primeira ordem, sendo que a constante de velocidade de reação foi de 0,0540 e  $t_{90\%}$  igual a 1,95 dias.

- O principal produto da degradação térmica do maleato de enalapril parece ser o derivado dicetopiperazínico. Todavia, a análise por CLAE evidenciou outros dois possíveis produtos de degradação, cujos tempos de retenção apresentaram valores próximos àquele obtido para o derivado cíclico e sobre os quais não existem referências na literatura. Estudos posteriores são necessários para seu isolamento e identificação.





- ALLINGER, N.L., CAVA, M.P., JONGH, D.C., JOHNSON, C.R., LEBEL, N.A., STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1985.
- ANDERSSON, R.G.G., KARLBERG, B.E., LINDGREN, B.R., PERSSON, K., ROSENQVIST, U. Enalaprilat, but not Cilazaprilat, Increases Inflammatory Skin Reactions in Guinea-Pigs. **Drugs**, v. 41, p. 48-53, 1991. Suppl. 1.
- ANDREATTA, S.H., AVERRIL, D.B., SANTOS, R.A.S., FERRARIO, C.M. The Ventrolateral medulla: A New Site of the Action of the Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, v. 11, p. 1163-1166, 1988. Suppl. 1.
- ANDRONICO, G., PIAZZA, G., MANGANO, M.T., MULE, G., CARONE, M.B., CERASOLA, G. Nifedipine vs Enalapril in Treatment of Hypertensive Patients with Glucose Intolerance. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 18, p. S52-S54, 1991. Suppl. 10.
- AUTERHOFF, H., KNABE, J., HÖLTE, H.D. **Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1991. p. 638-640.
- BARROS, R.T., ABRAHAO, S.B., IBARRA, M.Z., MARCONDES, M.M. Renal Function and Overt Proteinuria in Diabetic Nephropathy: Effects of Enalapril. **Hypertension**, v. 17, p. 420, 1991.
- BARTROLI, J., RAMIS, J., MARIR, A., FARR, J. Synthesis of Enalapril Maleate. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 23, n. 7, p. 771-777, 1986.
- BASOLO, F., JOHNSON, R. **Química de los Compuestos de Coordinación**. Barcelona: Reverté, 1978.

- BAUER, J.H., REAMS, G.P. Renal Protective Effect of Long Term Antihypertensive Therapy with Enalapril. **Drugs**, v. 35, p. 62-71, 1988. Suppl. 5.
- BENJAMIN, D.M., MCCORMACK, J.J., GUM, D.W. Use of Newer Amino Group Reagents for the Detection and Determination of Kanamycin. **Analitical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1531-1534, 1973.
- BIOLLAZ, J., SCHELLING, J.L., COMBES, J.B., BRUNNER, D.B., DESPONDS, G. Enalapril Maleate and Lysine Analogue (MK 521) in Normal Volunteers; Relationship between Plasma and the Renin Angiotensin System. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 14, p. 363-368, 1982.
- BJÖRCK, S., MULEC, H., JOHNSEN, S.A., NYBERG, G., AURELL, M. Contrasting Effects of Enalapril and Metoprolol on Proteinuria in Diabetic Nephropathy. **British Medical Journal**, v. 300, p. 904-907, 1990.
- BLUMENTHAL, J.A., EKELUND, L.G., EMERY, C. Quality of Life Amongst Hypertensive Patients with a Diuretic Background who are Taking Atenolol and Enalapril. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, p. 447-453, 1990.
- BRUNNER, H.R., WAEBER, B., NUSSBERGER, J., SCHALLER, M.D. Long-Term Clinical Experiences with Enalapril in Essential Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 1, p. 103-107, 1983. Suppl. 1.
- BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index**. 11. ed. Rahway: Merck, 1989. p. 557-558: enalapril.

- CALDWELL, P.R.B., SEEGER, B.C., HSU, K.C., SOFFER, R.L.D.M. Angiotensin Converting Enzyme: Vascular Endothelial Localization. **Science**, v. 191, p. 1050-1051, 1976.
- CALÒ, L., CANTARO, S., FAVARO, S., PLEBANI, M., BORSATTI, A. Urinary Excretion of Prostanoids During Treatment with Enalapril Compared with Captopril. **Current Therapeutic Research**, v. 49, p. 376-382, 1991.
- CAMPBELL, D.J. Circulating and Tissue Angiotensin Systems. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 1-6, 1987.
- CAMPOS, L.M.M. **Contribuição ao Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos Contendo o Antibiótico Gentamicina**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1980. Dissertação (Mestrado em Farmácia)
- CANNON, P.J., CRILEY, J.M., DZAU, V.J., FRANCIOSA, J.A., GREENBERG, M.A. A Placebo-Controlled Trial of Captopril in Refractory Chronic Congestive Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 2, p. 755-763, 1983.
- CHALLENGER, V.F. , WALLER, D.G., HAYWARD, R.A., GRIFFIN, M.J., ROATH, O.S. Subjective and Objective Assessment of Enalapril in Primary Raynaud's Phenomenon. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 477-480, 1991.
- CHAN, J.C.N., COKRAN, C., NICHOLLS, G., CHEUNG, C.K., SWAMIRATHAN, R. A Randomised Double-Blind, PlaceboControlled Study of Enalapril and Nifedipine in the Treatment of Hypertension in Patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 40, p. 370A, 1991. Suppl. 1.

CHATTERJEE, K., DE MARCO, T. Systemic and Coronary Haemodynamics and Pharmacodynamics of Enalapril and Enalaprilat in Congestive Heart Failure. **Drugs**, v. 39, p. 29-40, 1990. Suppl. 4.

CHENG, I.K.P., MA, J.T.C., YEH, G.R., CHAN, M.K. Comparison of Captopril and Enalapril in the Treatment of Hypertension in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus and Nephropathy. **International Urology and Nephrology**, v. 22, p. 295-303, 1990.

CLAUSER, E., GONZALEZ, M.F., BOUHNICK, J., CORVOL, P., MÉNARD, J. The Effects of Converting Enzyme Inhibitors on Plasma Angiotensinogen and Plasma Aldosterone in Sodium-Depleted Rats. **Journal of Hypertension**, v. 1, p. 37-40, 1983. Suppl. 1.

CLELAND, J.G.F., DARGIE, H.J., GILLEN, G., HODSMAN, G.P., BALL, S.G. Effects of Enalapril on Clinical State and Serum Electrolytes in Congestive Heart Failure. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 542P-543P, 1985.

COHEN, M.L., KURTZ, K.D. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition in Tissues from Spontaneously Hypertensive Rats after Treatment with Captopril and MK-421. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 220, p. 63-69, 1982.

CONNORS, K.A. **Curso de Análisis Farmacéutico**. Barcelona: Reverté, 1980.

CONNORS, K.A., AMIDON, G.L., STELLA, V.J. **Chemical Stability of Pharmaceuticals**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

COOPER, W.D., SHELDON, D., BROWN, D., KIMBER, G.R., ISITT, V.L. Post-Marketing Surveillance of Enalapril: Experience in 11710 Hypertensive Patients in General Practice. **Journal of the Royal College of General Practitioners**, v. 37, p. 346-349, 1987.

COTTON, M.L., WU, D.W., VADAS, E.B. Drug-Excipient Interaction Study of Enalapril Maleate Using Thermal Analysis and Scanning Electron Microscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, p. 129-142, 1987.

DALLA COSTA, T.C.T. **Comparação da Biodisponibilidade de Comprimidos de Aminofilina**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia)

DAS GUPTA, V. Stoichiometric Balances and Stability Constants of Amine-Bromothymol Blue Complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60, n. 10, p. 1584-1586, 1971.

DAS GUPTA, V., CADWALLADER, D.E. Acid Dye Method for the Analysis of Thiamine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 112-116, 1968.

---

. Determination of First  $pK_a'$  Value and Partition Coefficients of Bromothymol Blue **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 12, p. 2140-2142, 1968.

DAS GUPTA, V., CADWALLADER, D.E., HERMEN, H.B., HONIGBERG, I.L. Effect of pH and Dye Concentration on the Extraction of a Thiamine Dye Salt by an Organic Solvent. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 7, p. 1199-1202, 1968.

DAS GUPTA, V., HERMEN, H.B. Selection of Best pH Range for Extraction of Amine Bromothymol Blue Complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 311-313, 1973.

DAVIES, R.O., GOMEZ, H.J., IRVIN, J.D., WALKER, J.F. An Overview of the Clinical Pharmacology of Enalapril. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 215S- 229S, 1984.

DZAU, V.J. Mechanism of Action of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors in Hypertension and Heart Failure. Role of Plasma versus Tissue ACE. **Drugs**, v. 39, p. 11-16, 1990. Suppl. 2.

DZAU, V.J., PRATT, R.E. Renin-Angiotensin System: Biology, Physiology and Pharmacology. In: FOZZARD, H. et al. (ed). **The Heart and Cardiovascular System**. New York: Raven Press, 1986. p. 1631-1661.

ERTL, G., ALEXANDER, R.W., KLONER, R.A. Interactions between Coronary Occlusion and the Renin-Angiotensin System in the Dog. **Molecular Brain Research**, v. 2, p. 149-158, 1987.

EVANGELISTA, R.C. **Contribuição ao Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos de Antibióticos Aminoglicosídicos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1981. Dissertação (Mestrado em Farmácia)

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERDER, L.F., INSERRA, F., DACCORDI, H., ROMANO, L., FERNANDEZ, A., TESSLER, J. Effects of Enalapril on Renal Parameters in Patients with Primary Glomerulopathies Associated with Chronic Renal Failure. **Drugs**, v. 39, p. 40-46, 1990. Suppl. 2.

FERNER, R.E., KAMALI, F., RAWLINGS, M.D. The Effect of Enalapril and Sulindac on Dermal Response to Substance P and Neurokinin A. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 114-116, 1991.

FERRARIO, C.M. Importance of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAS) in the Physiology and Pathology of Hypertension. An Overview. **Drugs**, v. 39, p. 1-8, 1990. Suppl. 2.

FITZ, A., LAWTON, W., REIMER, J., NELSON, G. The Effects of Enalapril, a Non-Thiol Converting Enzyme Inhibitor, on Vasoactive Factors in Hypertension. **Clinical Research**, v. 30, p. 775A, 1982.

FRIEDMAN, D.I., AMIDON, G.L. Intestinal Absorption Mechanism of Dipeptide Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors of the Lysil-Proline Type: Lisinopril and SQ 29.852. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 12, p. 995-998, 1989.

FROHLICH, E.D. Angiotensin Converting Inhibitors. Present and Future. **Hypertension**, v. 13, p. 1125-1130, 1989. Suppl. 1.

GAUDY, D. **Contribution a l'Optimisation des Preparations Galeniques a Base de Noix vomique Mises au Point Technologiques et Analytiques.** Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1984

GAVRAS, H. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Calcium Channel Blockers ? An Overview. **Drugs**, v. 39, p. 73-75, 1990. Suppl. 2.



GAVRAS, H., BIOLLAZ, J., WAEBER, B., BRUNNER, H.R., GAVRAS, I., DAVIES, R.O. Antihypertensive Effect of the New Oral Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, MK-421. **Lancet**, v. 2, p. 543-547, 1981.

GENNARO, A.R. (Ed.). **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 17. ed. Easton: Mack, 1985.

GILES, T.D. Clinical Experience with Lisinopril in Congestive Heart Failure. Focus on the Older Patient. **Drugs**, v. 39, p. 17-22, 1990. Suppl. 2.

GHOSH, P.B., WHITEHOUSE, M.W. 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole: A New Fluorogenic for Amino Acids and Other Amines. **Biochemical Journal**, v. 108, n. 1, p. 155-156, 1968.

GROSS, D.M., SWEET, C.S., ULM, E.H., BACKLUND, E.P., MORRIS, A.A. Effect of N-[(S)-1-Carboxy-3-Phenylpropyl]-L-Ala-L-Pro and its Ethyl Ester (MK-421) on Angiotensin converting Enzyme *in vitro* and Angiotensin I Pressor Responses *in vivo*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 216, p. 552-557, 1981.

GUERET, P., ARTIGOU, J.Y., BENICHO, M., BERLAND, J., FRESSINAUD, P., GROLLIER, G, DUC, L.N.C. Efficacy and Safety of Enalapril and Sustained-Release Nifedipine in Patients with Mild to Moderate Hypertension. **Drugs**, v. 39, p. 67-72, 1990. Suppl. 2.

HEDNER, T., SAMUELSSON, O., LUNDE, H., LINDHOLM, L., ANDREN, L., WIHOLM, B.E. Angio-Oedema in Relation to Treatment with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **British Medical Journal**, v. 304, n. 6832, p. 941-946, 1992.

- HELMAN, J. **Farmacotecnia Teorica y Practica**. México: Continental, 1981. v. 6.
- HENNESSY, A., HORVÀTH, J. Newer Antihypertensive Agents in Pregnancy. **Medical Journal of Australia**, v. 156, p. 304-305, 1992.
- HOCKINGS, N., AJAYI, L.A.A., HUGHES, D.M., LEES, K.R., REID, J.L. Effects of Age on the Pharmacodynamic Responses to the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors Enalapril and Enalaprilat. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 140P, 1985.
- HODSMAN, G.P., BROWN, J.J., CUMMINGS, A.M.M., DAVIES, D.L., EAST, B.W. Enalapril in the Treatment of Hypertension with Renal Artery Stenosis. **British Medical Journal**, v. 287, p. 1413-1417, 1983.
- HODSMAN, G.P., ZABLUDOWSKI, J.R., ZOCCALI, C., FRASER, R., MORTON, J.J. Enalapril (MK-421) and its Lysine Analogue (MK-521): A Comparison of Acute and Chronic Effects on Blood Pressure, Renin-Angiotensin System and Sodium Excretion in Normal Man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 233, 1984.
- HIBBERT, M. Shedding Light on Stability Testing. **Manufacturing Chemist**, v. 62, p. 32-33, 1991.
- HORVÀTH, C., MELANDER, W., MOLNAR, I. Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationery Phases. **Journal of Chromatography**, v. 125, p. 129-156, 1976.

HULL, R.L., BILES, J.A. Physical-Chemical Study of the Distribution of Some Amine Salts Between Immiscible Solvents II. Complexation in the Organic Phase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 8, p. 869-872, 1964.

INSERRA, F., DACCORDI, H.A., MARTELLO, M.A., FERDER, L.F. Enalapril Effects on Hypertensive Patients with Proteinuria and Impaired Glucose Metabolism. **Diabetes**, v. 40, p. 506A, 1991. Suppl. 1.

IF, D.P., BRENNER, G.S. Enalapril Maleate. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 16, p. 207-243, 1987.

IF, D.P., BRENNER, G.S., STEVENSON, J.M., LINDENBAUM, S., DOUGLAS, A.W., KLEIN, S.D., McCAULEY, J.A. High Resolution Spectroscopic Evidence and Solution Calorimetry Studies on the Polymorphs of Enalapril Maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 28, p. 183-191, 1986.

JACKSON, B., CUBELA, R., JOHNSTON, C.I. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: Measurement of Relative Inhibitory Potency and Serum Drug Levels by Radioinhibitor Binding Displacement Assay. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 9, p. 699-704, 1987.

---

. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Measurement in Human Serum Using Radioinhibitor Ligand Binding. **Aust. J. Exp. Med. Sci.**, v. 64, n. 2, p. 149-155, 1986.

---

. Effect of Dietary Sodium on Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition and the Acute Hypotensive Effect of Enalapril (MK-421) in Essential Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 2, p. 371-377, 1984.

JAMIESON, M.J., WEBSTER, J., FOWLER, G., RAWLES, J., SMITH, F.W., PETRIE, J.C. A Comparison of the Chronic Effects of Oral Xamoterol and Enalapril on Blood Pressure and Renal Function in Mild to Moderate Heart Failure. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 305-312, 1991.

JIN, M., WILHELM, M.J., LANG, R.E., UNGER, T., LINDPAINTNER, K. Endogenous Tissue Renin-Angiotensin Systems. **American Journal of Medicine**, v. 84, n. 3A, p. 28-33, 1988.

JOHNSTON, C.I. Biochemistry and Pharmacology of the Renin-Angiotensin System. **Drugs**, v. 39, p. 21-31, 1990. Suppl. 1.

JOHNSTON, C.I., JACKSON, B.J., LARMOUR, I., CUBELLA, R., CASLEY, D. Plasma Enalapril Levels and Hormonal Effects After Short and Long-Term Administration in Essential Hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 233S-239S, 1984. Suppl. 2.

KABASAKALIAN, P., KALLINEY, S., MAGATTI, A.W. Determination of Gentamicin Complex Components in Fermentation Broth by *in situ* Fluorimetric Measurements of 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole Derivatives. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 953-955, 1977.

KAMEI, J., KASUYA, Y. The Effect of Hydrochlorothiazide on the Enhanced Coughing Associated with Treatment with Enalapril. **European Journal of Pharmacology**, v. 213, p. 137-139, 1992.

KATO, T. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Enalapril in Pharmaceuticals with Bromothymol Blue. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 339-344, 1985.

KAUFMAN, J., SCHMITT, S., BARNARD, J., BUSSE, W. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Patients with Bronchial Responsiveness and Asthma. **Chest**, v. 101, n. 4, p. 922-925, 1992.

KLAGES, F. **Tratado de Química Orgánica**. Barcelona: Reverté, 1968. v. 3, p. 496, 730.

KLAHR, S. The Modification of Diet in Renal Disease Study. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 864-866, 1989.

KNAPP, G. Dissolution Testing: Its Increasing Role. **Pharmaceutical Technology**, v. 1, p. 12-13, 1977.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984.

LAROCHELLE, P., GUTKOWSKA, J., SCHIFFRIN, E., KUCHEL, O., HAMET, P. Effect of Enalapril on Renin, Angiotensin Converting Enzyme Activity, Aldosterone and Prostaglandins in Patients with Hypertension. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 8, p. 197-201, 1985.

LAWRENCE, J.F., FREI, R.W. Fluorogenic Labeling of N-Methyl and N,N-Dimethylcarbamates with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2,1,3-Oxadiazole. **Analytical Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2046-2049, 1972.

LECOMPTE, D. Validation d'une Methode de Dosage par Chromatographie Liquide. **S.T.P. Pharma**, v. 2, p. 843-849, 1986.

LI, N., DOODY, E. Polarographic, Potenciometric and Conductometric Studies on the Aspartate and Alalinate Complexes of Cooper. **Journal of American Chemical Society**, v. 72, p. 1891-1894, 1950.

LIEBERMAN, H.A., LACHMAN, L., SCHATZ, J.B. (Ed.) **Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 2.

LINDA, L.N. Quantitative Determination of Compounds in Aqueous Methylcellulose by Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1142-1144, 1981.

LINZ, K.W., SCHÖLKENS, B.A., HAN, Y.F. Beneficial Effects of Converting Enzyme Inhibitor, Ramipril, in Schemic Rat Hearts. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, p. S91-S99, 1986.

LOEPER, J.M., GROB, R.L. Determination of Water in Solid Samples Using Headspace Gas Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 463, p. 365- 374, 1989.

MacGREGOR, G.A., MARKANDU, N.D., BAYLISS, J., ROULSTON, J.E., SQUIRES, M. Non-Sulphydryl-Containing Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (MK-421): Evidence for a Role of Renin System in Normotensive Subjects. **British Medical Journal**, v. 283, p. 401-403, 1981.

MARRE, M., LEBLANC, PASSA, P. Effects of Converting Enzyme Inhibition with Enalapril Administered to Hypertensive Insulin-Dependent Diabetics (IDD). **Journal of Hypertension**, v. 3, p. 552, 1985.

- MARTELLO, M.A., DACCORDI, H.A., FERDER, L.F., INSERRA, F., PANZALIS, M.M.C. Enalapril versus Nifedipine in Diabetic Patients with Hypertension and Proteinuria. **Diabetes**, v. 40, p. 506A, 1991. Suppl. 1.
- MASCHIO, G., OLDRIZZI, L., RUGIU, C. Long-Term Clinical Effects of Enalapril (E) on Progression of Chronic Renal Failure (CRF). **Kidney International**, v. 33, p. 379, 1988.
- McFATE, W.S., KULAGA, S.F., MONCLOA, F., PINGEON, R., WALKER, J.F. Overall Tolerance and Safety of Enalapril. **Journal of Hypertension**, v. 2, p. 113-117, 1984. Suppl. 2.
- MELANDER, W.R., JACOBSON, J., HORVÀTH, C. Effect of Molecular Structure and Conformational Change of Proline-containing Dipeptides in Reversed-Phase Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 234, n. 2, p. 269-276, 1982.
- MEYER, T.W., ANDERSON, S., RENNKE, H.G., BRENNER, B.M. Converting Enzyme Inhibitor Therapy Limits Progressive Glomerular Injury in Rats with Renal Insufficiency. **American Journal of Medicine**, v. 79, p. 31-36, 1985. Suppl. 3C.
- MORRIS, B.J. Human Renin Protein and Gene Structures: Present and Future Targets for Renin Blockade in Treatment of Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 7, n. 2, p. S9-S14, 1989.
- NARANJO, C.A., KADLEC, K.E., SANHUEZA, P., WOODLEY-REMUS, D., SELLERS, E.M. Enalapril Effects on Alcohol Intake and other Consummatory Behaviors in Alcoholics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 50, p. 96-106, 1991.

- NOORMOHAMED, F.H., McNABB, W.R., LANT, A.F. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Actions of Enalapril in Humans: Effect of Probenecid Pretreatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, n. 1, p. 362-368, 1990.
- NUDELMAN, N.E.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.
- OHLWEILER, O.A. **Química Analítica Quantitativa**. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1984. v. 1.
- OKLOBDIZIJA, M., KUFTINEC, J., HOHNJEC, M., KAJFEZ, F. Physico-Chemical and Analytical Characteristics of Enalapril. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v. 38, p. 167-181, 1988.
- OPARIL, S., HORTON, R., WILKINS, L.H., IRVIN, J., HAMMETT, D.K. Antihypertensive Effect of Enalapril (MK-421) in low Renin Essential Hypertension: Role of Vasodilator Prostaglandins. **Clinical Research**, v. 31, p. 538A, 1983.
- OPSAHL, J.A., ABRAHEM, P.A., KEANE, W.F. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Chronic Renal Failure. **Drugs**, v. 39, p. 23-32, 1990. Suppl. 2.
- OSTER, J.R., MATERSON, B.J. Renal and Electrolyte Complications of Congestive Heart Failure and Effects of Therapy with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **Archives of Internal Medicine**, v. 152, n. 4, p. 704-710, 1992.
- OTTO, H.H. ACE-Hemmer aus Pharmazeutisch-Chemischer Sicht. **Pharmazeutisch Zeitung**, v. 134, n. 3, p. 133-139, 1989.



- PALMER, A.J., BEEVERS, D.G., BULPITT, C.J., BUTLER, A., COLES, E.C. Mortality Associated with captopril and Enalapril: A Report from the DHSS Hypertension Care Computing Project. **Journal of Hypertension**, v. 88, p. 521-524, 1990.
- PATCHETT, A.A. et al. A New Class of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **Nature**, v. 288, p. 280-283, 1980.
- PATCHETT, A.A. The Chemistry of Enalapril. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 201S-206S, 1984.
- PELKONEN, K., YLITALO, P. Absorption of Oral Enalapril in Germ-Free and Microbially-Associated Rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 14, n. 2, p. 101-105, 1989.
- PIANETTI, G.A. **Controle de Qualidade de Duas Formas Farmacêuticas Contendo "Sulfametoxazol + Trimetoprima"**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1986. Dissertação (Mestrado em Farmácia)
- POOLE-WILSON, P.A. Drug Treatment of Heart Failure. **Drugs**, v. 39, p. 25-28, 1990. Suppl. 4.
- PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1981. v. 1.
- RAJI, L., CHIOU, X.C., OWENS, R., WRIGLEY, B. Therapeutic Implications of Hypertension-Induced Glomerular Injury. **American Journal of Medicine**, v. 79, p. 37-41, 1985. Suppl. 3C.

- REDMAN, C.W.G., KELLY, J.G., COOPER, W.D. The Excretion of Enalapril and Enalaprilat in Human Breast Milk. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, p. 99, 1990.
- RHEUBAN, K.S., CARPENTER, M.A., AYERS, C.A., GUTGESELL, H.P. Acute Hemodynamic Effects of Converting Enzyme Inhibition in Infants with Congestive Heart Failure. **Journal of Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. 668-670, 1990.
- RUILOPE, L.M., MIRANDA, B., MORALES, J.M. Converting Enzyme Inhibition in Chronic Renal Failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 13, p. 120-126, 1989.
- RUIZ, A.M., FELIU, J.F. A Cooperative Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Enalapril in Puerto Rican Patients with Mild to Moderate Hypertension. **Drugs**, v. 39, p. 77-82, 1990. Suppl. 2.
- SALAMOUN, J., SLAIS, K. Elimination of Peak Splitting in the Liquid Chromatography of the Prolin-Containing Drug Enalapril Maleate. **Journal of Chromatography**, v. 537, p. 249-257, 1991.
- SÁNCHEZ, R.A., MARCÓ, E., GILBERT, H.B., RAFFAELE, P., BRITO, M. Natriuretic Effect and Changes in Renal Haemodynamics induced by Enalapril in Essential Hypertension. **Drugs**, v. 30, p. 49-58, 1985. Suppl. 1.
- SASTRY, C.S.P., SAILAJA, A., RAO, T.T. Determination of Captopril by Two Simple Spectrophotometric Methods Using Oxidative Coupling Reaction. **Pharmazie**, v. 46, p. 465, 1991.

- SCHAAF, L.J., TREMEL, L.C., WULF, B.G., VERNON, K.K. Compatibility of Enalaprilat with Dobutamine, Dopamine, Heparin, Nitroglycerin, Potassium Chloride and Nitroprusside. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 15, p. 371-376, 1990.
- SCHIFFRIN, E.L., GUTKOWSKA, J., THIBAUT, G., GENEST, J. Effect of Enalapril (MK-421), an Orally Active Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitor, on Blood Pressure, Active and Inactive Plasma Renin, Urinary Prostaglandin-E<sub>2</sub>, and Kallikrein Excretion in Conscious Rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, p. 116-123, 1984.
- SIDHU, A.S., KENNEDY, J.M., DEEBLE, S. General Method for the Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 391, p. 233-242, 1987.
- SHIONOIRI, H., GOTOH, E., MIYAZAKI, N., YASUDA, G., TAKAGI, N. Serum Concentration and Effects of a Single Dose of Enalapril Maleate in Patients with Essential Hypertension. **Japanese Circulation Journal**, v. 49, p. 46-51, 1985.
- SHIROMANI, P.K., BAVITZ, J.F. Effect of Moisture on the Physical and Chemical Stability of Granulations and Tablets of the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, Enalapril Maleate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 12, n. 14, p. 2467-2480, 1986.
- SKIDGEL, R.A., ENGELBRECHT, S., JOHNSON, A.R., ERDÖS, E.G. Hydrolysis of Substance P and Neurotensin by Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase. **Peptides**, v. 5, p. 769-776, 1984.

SKIDGEL, R.A., ERDÖS, E.G. Novel Activity of Human Angiotensin I Converting Enzyme: Release of the NH<sub>2</sub> and COOH-Terminal Tripeptides from the Luteinizing Hormone-Release Hormone. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 82, p. 1025-1029, 1985.

STROCCHI, E., MALINI, P.L., CIAVARELLA, A., RICCI, C., VALTANCOLI, G., MUSTACCHIO, A., VANNINI, P., AMBROSIONI, E. The Effect of ACE Inhibition on Peripheral Hemodynamics in Normotensive and Hypertensive Patients with Type II Diabetes. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 140-143, 1991.

SVOLMANIS, A.P., BOURA, A.L.A. Converting Enzyme Inhibition in the Rat is Accompanied by Potentiation of Inflammation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 10, p. 723, 1983.

SWANSON, B.N., VLASSES, P.H., FERGUSON, R.K., BERGQUIST, P.A., TILL, A.E. Influence of Food on the Bioavailability of Enalapril. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1655-1657, 1984.

SWEET, C.S., GROSS, D.M., ARBEGAST, P.T., GAUL, S.L., BRITT, P.M. Antihypertensive Activity of N-[(S)-(Ethoxycarbonyl)-3-Phenylpropyl]-L-Ala-L-Pro (MK-421), an Orally Active Converting Enzyme Inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 216, p. 558-566, 1981.

THOMPSON, D.F., ALLEN, L.V.Jr., STILES, M.L. Visual Compatibility of Enalaprilat with Selected Intravenous Medications During Simulated Y-Site Injection. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 47, p. 2530-2531, 1990.

TOCCO, D.J., DE LUNA, F.A., DUNCAN, A.E.W., VASSIL, T.C., ULM, E.H. The Physiological Disposition and Metabolism of Enalapril Maleate in Laboratory Animals. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 10, n. 1, p. 15-19, 1982.

TODD, P.A., HEEL, R.C. Enalapril: A Review of its Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Properties, and Therapeutic Use in Hypertension and Congestive Heart Failure. **Drugs**, v. 31, p. 198-248, 1986.

TODD, P.A. & GOA, K.L. Enalapril: A Reappraisal of its Pharmacology and Therapeutic Use in Hypertension. **Drugs**, v. 43, n. 3, p. 346-381, 1992.

ULM, E.H., HICHENS, M., GOMEZ, H.J., TILL, A.E., HAND, E., VASSIL, T.C., BIOLLAZ, H.R., BRUNNER, H.R., SCHELLING, J.L. Enalapril Maleate and Lysine Analogue (MK-521): Disposition in Man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 14, p. 357-362, 1982.

ULM, E.H. Enalapril Maleate (MK-421), a Potent Nonsulfhydryl Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor: Absorption, Disposition and Metabolism in Man. **Drug Metabolism Reviews**, v. 14, n. 1, p. 99-110, 1983.

UNGER, T., GANTEN, D., LANG, R.E., SCHÖLKENS, B.A. Is Tissue Converting Enzyme Inhibition a Determinant of the Antihypertensive Efficacy of Converting Enzyme Inhibitors? Studies with the Two Different Compounds, Hoe 498 and MK 421, in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p. 872-880, 1984.

\_\_\_\_\_. Persistent Tissue Converting Enzyme Inhibition Following Chronic Treatment with Hoe 498 and MK 421 in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 7, p. 36-41, 1985.

USP DI - Drug Information for the Health Care Professional. 10. ed. United States Pharmacopeial Convention, Kingsport: Arcat Graphics, 1990. v. IA.

USP XXII - The United States Pharmacopeia. 22. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 1990.

VAIZOGLU, M.O. Aim of Dissolution Studies and Evaluation of Dissolution Data. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 90, n. 1, p. 63-69, 1981.

VAN GILST, W.H., GRAEFF, P.A., WESSELING, H., LANGEN, C.D. Reduction of Reperfusion Arrhythmias in the Schemic Isolated Rat Heart by Angiotensin Converting Inhibitors: A comparison of Captopril, Enalapril, and Hoe 498. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 8, p. 722-728, 1986.

VAUCHER, L.R.C. **Métodos Físico-Químicos para Doseamento de Antibióticos Polipeptídicos - Bacitracina e Polimixina B**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1987. Dissertação (Mestrado em Farmácia)

VLASSES, P.H., LARIJANI, G.E., CONNER, D.P., FERGUSON, R.K. Enalapril, a Nonsulfhydryl Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. **Clinical Pharmacy**, v. 4, p. 27-40, 1985.

VLASSES, P.H., FERGUSON, R.K., SMITH, J.B., ROTMENSCH, H.H., SWANSON, B.N. Urinary Excretion of Prostacyclin and Thromboxane A<sub>2</sub> Metabolites After Angiotensin Converting Enzyme Inhibition in Hypertensive Patients. **Prostaglandin Leukotrienes and Medicine**, v. 11, p. 143-150, 1983.

VOGEL, A. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

\_\_\_\_\_. **Análise Orgânica Qualitativa**. São Paulo: EDUSP, 1979. v. 3, p. 1119-1120.

VOIGT, R., BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnología Farmacéutica**. Zaragoza: Acribia, 1982.

WARNER, N.J., RUSH, J.E. Safety Profiles of the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. **Drugs**, v. 35, p. 89-97, 1988. Suppl. 5.

WELLS, T.G., BUNCHMAN, T.E., KEARNS, G.L. Treatment of Neonatal Hypertension with Enalaprilat. **Journal of Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. 664-667, 1990.

WILLARD, H., MERRITT, L., DEAN, J. **Análise Instrumental**. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1979.

WOOD, S.M., MANN, R.D., RAWLINS, M.D. Angio-Oedema and Urticaria Associated with Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. **British Medical Journal**, v. 294, p. 91-92, 1987.

WORLAND, P.J., JARROT, B. Radioimmunoassay for the Quantitation of Lisinopril and Enalaprilat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 5, p. 512-516, 1986.

WYNCKEL, A., REZAIGUIA, S., MELIN, J.P., CHARARD, J. Insuffisance Rénale Aiguë sous Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion. Un Diagnostic trop Fréquent. **Presse Médicale**, v. 20, p. 265-266, 1991.

WYVRATT, M.J., TRISTRAM, E.W., IKELER, T.J., LOHR, N.S., JOSHUA, H., SPRINGER, J.P., ARISON, B.H., PATCHETT, A.A. Reductive Amination of Ethyl-2-Oxo-4-Phenylbutanoate with L-Alanyl-L-Proline. Synthesis of Enalapril Maleate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 49, p. 2816-2819, 1984.

YEO, W.W., MACLEAN, D., RICHARDSON, P.J., RAMSAY, L.E. Cough and Enalapril: Assessment by Spontaneous Reporting and Visual Analogue Scale Under Double-Blind Conditions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 224P-225P, 1991.

YOUNG, W.R. Accelerated Temperature Pharmaceutical Product Stability Determinations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 4, p. 551-569, 1990.

ZANELLA, M.T., SALGADO, B.J.L., KOHLMANN, O., RIBEIRO, A.B. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition. Therapeutic Option for Diabetic Hypertensive Patients. **Drugs**, v. 39, p. 33-39, 1990. Suppl. 2.